

Struktur und Funktion des *tight junction*-Proteins
Occludin unter normoxischen und hypoxischen
Bedingungen

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Christian Bellmann

aus Berlin

Dezember 2013

Die Dissertation wurde in der Zeit vom 01. Januar 2010 bis zum 17. Dezember 2013 unter der Leitung von PD Dr. Ingolf E. Blasig am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ingolf E. Blasig
Molekulare Zellphysiologie
Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin
2. Gutachter: Professor Dr. Hans-Joachim Pflüger
Institut für Biologie
AG Neurobiologie
Freie Universität Berlin

Disputation am: 19.05.2014

Danksagung

PD Dr. Ingolf Blasig danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Gruppe Molekulare Zellphysiologie am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie durchführen zu können. Die Möglichkeit der aktiven Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen ermöglichten es mir mit meinem Thema am aktuellen wissenschaftlichen Diskurs teilzunehmen.

Dr. Reiner Haseloff danke ich für die unterhaltsamen aber hilfreichen Diskussionen, die sich aus Zwischenfragen ergaben und mir neue Perspektiven eröffneten.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Burkhard Wiesner, Jenny Eichhorst und Dr. Anke Teichmann für die vielen geduldigen Einsätze am Mikroskop sowie Hilfe beim Durchdringen und Abwägen neuer Lösungsansätze.

Einen großen Dank an alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder der Arbeitsgruppe. Das ehrliche und sehr kameradschaftliche Miteinander hat mich auch in schweren Phasen immer motiviert und vorangebracht. Wissenschaftlich und menschlich war diese Zusammenarbeit eine tolle Erfahrung.

Meiner Frau Kathrin Bellmann danke ich für alle Einsätze, die mir ermöglichten mich in die Arbeit zu vertiefen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	11
1.1 Epithelien und Endothelien	11
1.2 <i>Tight junctions</i>	12
1.3 Proteine der <i>tight junctions</i>	13
1.3.1 Claudine	13
1.3.2 Occludin	15
1.3.2.1 Aufbau und Eigenschaften von Occludin	15
1.3.2.2 Posttranslationale Modifikationen	17
1.3.2.3 Krankheitsrelevanz von Occludin	21
1.3.3 Trizellulin	27
1.3.4 MarvelD3	27
1.3.5 Weitere <i>tight junction</i> -assoziierte Proteine	28
1.4 Fragestellungen	29
2 Material und Methoden	32
2.1 Materialien	32
2.1.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme, Medien und Antikörper	32
2.1.2 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	34
2.2 Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1 Klonierung von humanem Occludin in CFP- und YFP-Expressionsvektoren	35
2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese	36
2.2.3 Transformation	38
2.2.4 DNA-Sequenzierung	38
2.3 Zellkultur und proteinbiochemische Methoden	39
2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	39
2.3.2 Transiente und stabile Transfektion eukaryotischer Zelllinien	40
2.3.3 Anlage und Reaktivierung von Kryokulturen eukaryotischer Zelllinien	41
2.3.4 Zellfixierung und immunocytochemische Färbung	42

2.3.5	Analyse lebender Zellen mit dem <i>laser scanning</i> -Mikroskop	42
2.3.6	Zelllyse, SDS-PAGE und Western Blot	43
2.3.7	Massenspektrometrie	44
2.3.8	Membranlokalisationsstudien	45
2.3.9	Messung der <i>trans</i> -Interaktionen (Anreicherungsstudien in Zell-Zellkontakten)	45
2.3.10	Messung der <i>cis</i> -Interaktionen (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)	46
2.3.11	Mobilitätsuntersuchungen (<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>)	48
2.3.12	Dichtheitsmessungen (TEER-Messungen und Cellmask-Diffusionsassay)	50
2.3.13	Gefrierbrüchelektronenmikroskopie	50
2.4	Sequenzalignements	51
2.5	Molekulare Modellierung	51
2.6	Statistik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Redoxsensitivität von Occludin	53
3.1.1	Occludin reagiert sensitiv auf oxidativen Stress	53
3.1.2	Cysteinaustauschmutanten induzieren veränderte Occludin-Expressionsmuster, <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Interaktionen und bestimmen in der zweiten extrazellulären Schleife die Redoxsensitivität von Occludin	55
3.1.3	Einfluss von Dithiothreitol auf Occludin und seine Cysteinmutanten	62
3.1.4	Auswirkung veränderter Redoxverhältnisse auf die Dimerisierung von Occludin	64
3.1.5	Identifizierung einer in die <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Homooligomerisierung involvierten Disulfidbrücke in der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin	66
3.1.6	Rolle von Transmembrandomänen bei der Homooligomerisierung von Occludin	68
3.1.7	Einfluss von Cysteinmutationen auf die parazelluläre Dichtheit	69
3.1.8	Occludin veränderte die phänotypischen Strangeigenschaften von Claudin-1	71
3.1.9	<i>In silico</i> -Modellierung der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin	72
3.1.10	Zweite extrazelluläre Schleife und Transmembrandomäne 1 - Bindungsareale für die Homooligomerisierung von Occludin	73
3.2	Phosphorylierungsabhängige Regulation der Interaktion Occludins mit ZO-1 sowie seiner Homodimerisierung	73
3.3	Tyrosinreste als weitere Determinanten der Dimerisierung und Funktion von Occludin	76
3.3.1	Membranlokalisations- und Dimerisierungsverhalten der Mutante Y220A	76

3.4	Der Cellmask-Diffusionsassay als Alternative zu Widerstands- und Permeabilitätsmessungen	79
3.5	Cysteinbasierte Interaktionen zwischen Occludin und Claudin-1	82
3.6	Cysteinbasierte Interaktionen zwischen Occludin und MarvelD3	83
4	Diskussion	85
4.1	Redoxsensitivität und deren strukturelle sowie funktionelle Konsequenzen für Occludin und die <i>tight junction</i>	85
4.2	Die Rolle membranständiger Cysteine bei der Homooligomerisierung von Occludin	93
4.3	<i>Tight junction</i> -Physiologischer Einfluss der Cysteinausauschmutanten von Occludin	95
4.4	Regulation der Homodimerisierung von Occludin und seiner strukturegebenden Assoziation zu ZO-1 durch Caseinkinase2-gesteuerte Occludinphosphorylierung	99
4.5	Eigenschaften der Occludinmutante Y220A	101
4.6	Dichtheitsmessungen mittels Cellmask-Diffusionsassay an occludin-transfizierten HEK-293-Zellen	102
4.7	Heterologe cysteinbedingte Interaktion von Occludin mit MarvelD3	104
5	Zusammenfassung	106
6	Summary	108
7	Literaturverzeichnis	110
8	Verzeichnis der eigenen Publikationen	135
9	Lebenslauf	137
10	Eidesstattliche Erklärung	138
11	Appendix	139

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des epi- bzw. endothelialen Transportphänotyps.	11
Abb. 1.2: Gefrierbruchelektronenmikroskopische (links) und schematische (rechts) Darstellung von <i>tight junction</i> -Strängen.	12
Abb. 1.3: Schema der Proteinbereiche von Occludin.	16
Abb. 1.4: Phosphorylierungsstellen am cytosolischen, C-terminalen Bereich von Occludin.	20
Abb. 1.5: Schematische Zusammenfassung einiger, unter Beteiligung von Occludin stehender, redoxabhängiger Signalkaskaden und ihrer Wechselwirkungen.	21
Abb. 2.1: Quantifizierung der Kontaktanreicherung als Ausdruck der <i>trans</i> -Interaktionen mittels Fluoreszenzintensitätsprofilen.	46
Abb. 2.2: Prinzip der Molekülinteraktion bei FRET-Messungen mit Ausbleichen des Akzeptors.	47
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Datenanalyse bei FRET-Messungen mit Ausbleichen des Akzeptors.	48
Abb. 2.4: Bleichen und Fluoreszenzrückkehr bei der FRAP-Messung.	49
Abb. 2.5: Quantifizierung der FRAP-Messungen.	49
Abb. 3.1: Membranlokalisation und <i>trans</i> -Interaktion von Occludin sind redoxsensitiv.	53
Abb. 3.2: FRET zwischen Occludinmonomeren unter Normoxie und Hypoxie an Zell-Zellkontakten transfizierter HEK-293-Zellen zeigten Redoxabhängigkeit bei der <i>cis</i> -Homooligomerisierung von Occ.	54
Abb. 3.3: Die Lokalisation von Occludin und seinen Cysteinmutanten sowie seine <i>trans</i> -Interaktionen zwischen gegenüberliegenden Zellmembranen waren cysteinabhängig und hypoxiesensitiv.	55
Abb. 3.4: Die Mutanten der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin zeigten eine starke Präsenz im endoplasmatischen Retikulum (ER).	56
Abb. 3.5: Occludin und seine Cysteinmutanten zeigten sowohl in unpolaren HEK-293- als auch in polaren MDCK-II-Zellen ähnliche zelluläre Lokalisation.	57
Abb. 3.6: Die Mutation C216A führte in MDCK-II-Zellen zur stärksten Reduktion der <i>trans</i> -Interaktionen.	58
Abb. 3.7: FRET-Messungen von Occludin (Occ) und seinen Cysteinmutanten an Zell-Zellkontakten transfizierter HEK-293-Zellen zeigten eine cytein-, hypoxie- und reduktantienabhängige homophile <i>cis</i> -Interaktion.	59

- Abb. 3.8:** Transfektion der Occludinmutante C216A in MDCK-II-Zellen zeigte bezüglich der Ausprägung der *cis*-Interaktionen am Zell-Zellkontakt ähnliche Ergebnisse wie die Transfektion in HEK-293-Zellen. 60
- Abb. 3.9:** FRAP-Messungen in transient transfizierten HEK-293-Zellen zeigten eine Beeinflussung der Mobilität von humanem Occludin durch Substitution der Cysteine an den Positionen 82, 216 und 237 gegen Alanin. 61
- Abb. 3.10:** FRET-Messungen in HEK-293-Zellen zeigten, dass die homophilen *cis*-Interaktionen von humanem Occludin (Occ) durch die Cysteine82 und -216 bestimmt werden. 62
- Abb. 3.11:** Dithiothreitol (DTT) reduzierte die Membranlokalisation von Occludin (Occ) Wildtyp (wt) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Blockern des Proteinnachschubes zur Zellmembran, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Membranlokalisation der Cystein-Substitutionsmutanten der zweiten extrazellulären Schleife (A). 63
- Abb. 3.12:** 5 mM Dithiothreitol (DTT) führte nur im Falle des Wildtyps (wt), nicht aber im Falle der Mutante C216A zu einer signifikanten Reduktion der *trans*-Interaktion von stabil transfizierten HEK-293-Zellen. 64
- Abb. 3.13:** Hypoxie und Cysteinsubstitution zu Alanin an Position 216 (zweite extrazelluläre Schleife) wirkten sich verstärkend auf die Dimerbildung von Occludin in Lysaten stabil transfizierter HEK-293-Zellen aus. 65
- Abb. 3.14:** Die Cysteine 216 und 237 von Occludin (Occ) bildeten eine Disulfidbrücke innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife (EVS2). 67
- Abb. 3.15:** Serinsubstitution des Cysteins237 (C237S) in der zweiten extrazellulären Schleife (EVS2) von Occludin (Occ) reduzierte die *trans*- und *cis*-Interaktionen, während die Substitution des Cysteins82 (TMD1) gegen Serin (C82S) die *cis*-Interaktion nicht beeinflusste. 68
- Abb. 3.16:** Occludin (Occ) *knockdown* (KD) in MDCK-II-Zellen führte zu einer Reduktion des TEER Maximums um ca. 50%. 69
- Abb. 3.17:** Die Substitution von Cystein gegen Alanin an Position C76 in TMD1 von Occludin (Occ) führte zu einem Anstieg der parazellulären Dichtheit von MDCK-II-Zellen. 70
- Abb. 3.18:** Die Substitutionsmutation C76A in Occludin (Occ), kotransfiziert mit Claudin-1 (Cld-1) in HEK-293-Zellen, führte zu einer Veränderung der Strangmorphologie von Cld-1. 71

- Abb. 3.19:** *In silico*-Modellierung der zweiten extrazellulären Schleife (EZS2) von Occludin (Occ) zeigt eine α -Helix und zwei β -Stränge, die sich gegenseitig durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Resten Cystein216 und -237 stabilisieren und ein Faltblatt bilden. 72
- Abb. 3.20:** Vermutete Bindungsareale für die homophile Oligomerisierung von Occludin (Occ) unter besonderer Berücksichtigung von Cysteinresten. 73
- Abb. 3.21:** Imitation der Phosphorylierung der Reste Thr400/Thr404/Ser408 in Occludin (Occ) beeinflusste die Bindung zu ZO-1. 74
- Abb. 3.22:** Phosphorylierungsimitation des Restes Ser408 in Occludin (Occ) führte zur Reduktion der Homodimerisierung. 75
- Abb. 3.23:** Die Caseinkinase (CK)-2-abhängige Phosphorylierung beeinflusste die *cis*-Interaktion von Occludin (Occ) in HEK-293-Zellen. 76
- Abb. 3.24:** Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte protektive Wirkung für die Membranlokalisation von Occludin gegen Hypoxie. 77
- Abb. 3.25:** Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte eine protektive Wirkung für die *trans*-Interaktion von Occludin gegen Hypoxie. 77
- Abb. 3.26:** Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte protektive Wirkung auf die *cis*-Interaktion von Occludin gegen Hypoxie. 78
- Abb. 3.27:** Die Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte keinen Einfluss auf die Mobilität von Occludin (Occ) in der Plasmamembran. 78
- Abb. 3.28:** Inkubation von stabil YFP-Y220A transfizierten HEK-293-Zellen unter Hypoxie für 3 h führte zu einer Zunahme des Dimeranteils von Occludin, ähnlich wie für den Wildtyp (wt). 79
- Abb. 3.29:** Claudin-1 (Cld-1) bildete eine Cellmask-Diffusionsbarriere an Zell-Zellkontakten zwischen transient transfizierten HEK-293-Zellen. 80
- Abb. 3.30:** Occludin (Occ) Wildtyp (wt) bildete keine Diffusionsbarriere an Zell-Zellkontakten zwischen transient transfizierten HEK-293-Zellen. 81
- Abb. 3.31:** Claudin-1 (Cld-1) bildete eine im Vergleich zum Occludin(Occ) Wildtyp (wt) signifikant schwächere Diffusionsbarriere für den Membranfarbstoff Cellmask aus. 81
- Abb. 3.32:** Cystein82 in Occludin (Occ) war nicht an der heterologen Interaktion zwischen Occ und Claudin-1 (Cld-1) beteiligt. 82
- Abb. 3.33:** Claudin-1 (Cld-1) rekrutierte Occludin (Occ) C216A zur Plasmamembran. 83

Abb. 3.34: Transiente Transfektion und FRET-Messungen von CFP-fusioniertem MarvelD3 (MD3, blau) und YFP-fusioniertem Occludin (Occ, gelb) in HEK-293-Zellen führte zu Kollokalisierung und cysteinabhängiger <i>cis</i> -Interaktion der Proteine.	84
Abb. A1: Sequenzalignement von Occludin zwischen verschiedenen Arten.	139

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Beispiele claudinassoziierter Erkrankungen	14
Tab. 1.2: Occludinregulierende Proteinkinasen und -phosphatasen und ihre Bedeutung	19
Tab. 1.3: Occludinassozierte Erkrankungen, Infektionen und pathologische Bedingungen	26
Tab. 2.1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte	32
Tab. 2.2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Medien	33
Tab. 2.3: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	34
Tab. 2.4: PCR-Programm für die Klonierung von humanem Occludin in die Expressionsvektoren pEYFP-C1 und pECFP-C1	35
Tab. 2.5: Darstellung der PCR-Abläufe bei der ortsgerichteten Mutagenese von humanem Occludin	36
Tab. 2.6: Verwendete Mutageneseprimer für die Induktion verschiedener Substitutionsmutanten in humanes Occludin (Occ)	37
Tab. 2.7: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer	39
Tab. 3.1: Zusammenstellung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide der YFP-Occludin-Monomerbande	66
Tab. 3.2: Zusammenstellung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide der YFP-Occludin-Dimerbande	66

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
AS	Aminosäure(n)
BHS	Blut-Hirnschranke
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
CFP	<i>cyan fluorescence protein</i>
CK	Caseinkinase
Cld	Claudin
CRFR	<i>Corticotropin releasing factor receptor</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
evtl.	eventuell
EZS	extrazelluläre Schleife
FKS	fetales Kälberserum
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
HBSS	Hanks Blank Salt Solution
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
JAM(s)	Junktionale(s) Adhensionsmolekül(e)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
MAGUK	<i>membrane associated guanylat kinase</i>
Marvel	<i>MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase(n)
NFκB	<i>nuclear factor kappa beta</i>
n.s.	nicht signifikant
Occ	Occludin
o.g.	oben genannte
PAGE	polyacryl gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
ROS	reaktive oxigene Spezies
rpm	rounds per minute,, Umdrehungen pro Minute
SEM	Standard Error of Means
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
Tab.	Tabelle
TAMP(s)	<i>tight junction associated marvel protein(s)</i>

TEER	transepi-/endothelialer Widerstand
TJ(s)	<i>tight junction(s)</i>
TMD	Transmembrandomäne(n)
ü.N.	über Nacht
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescence protein</i>
z.B.	zum Beispiel
ZO	zonula occludens
z.T.	zum Teil

Abkürzungen von Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen von Nucleotiden

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1. Einleitung

Erkrankungen wie z.B. Schlaganfall (Ingall, 2004), Tumoren (El-Tamer *et al.*, 2007), Höhenkrankheit (Bailey, 2000) oder chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Mannino, 2002) sind durch eine hohe Morbidität bzw. Mortalität gekennzeichnet. All diese Erkrankungen werden von Barrieredysfunktionen an Epi- oder Endothelien begleitet. Die Barriereigenschaften der betroffenen Gewebe werden maßgeblich von *tight junctions* (TJs) und ihrer Proteinzusammensetzung bestimmt. Die o.g. Krankheiten gehen mit Hypoxie und/oder reduzierenden Bedingungen einher und führen zu Veränderungen der TJs. Die Arbeit untersucht deshalb insbesondere hypoxische Störungen und reduzierende Bedingungen sowie Alterationen der molekularen Struktur der TJs. Dabei wird v.a. das transmembranale TJ-Protein Occludin hinsichtlich seiner redoxabhängigen Homo- und Heterodimerisierung analysiert. Für Occludin wird eine regulatorische Funktion auf die TJ-Architektur unter oxidativem Stress postuliert (Blasig *et al.*, 2011).

1.1 Epithelien und Endothelien

Höhere Vielzeller sind Aggregationen aus mehr als 200 spezialisierten Zelltypen, die miteinander kommunizieren. Mit der Entstehung von Organsystemen und der damit verbundenen Abgrenzung von Kompartimenten im Organismus bilden sich Epithelien und Endothelien heraus. Physiologische Prozesse, wie z.B. Osmoregulation, Verdauung oder Sinneswahrnehmungen basieren häufig auf gerichteten Transportprozessen durch diese Barrieren. Epithelien und Endothelien sind ein- oder mehrschichtige Zellverbände, die Kompartimente voneinander abgrenzen und so getrennte Reaktionsräume schaffen, welche die Basis lebenswichtiger Funktionen sind. Funktionelle Grundlage dieser Gewebe ist der „epi-/endotheliale Transportphänotyp“: Transzellulärer Transport durch die Zelle und passive Diffusion von Ionen durch den parazellulären Spalt (Abb. 1.1).

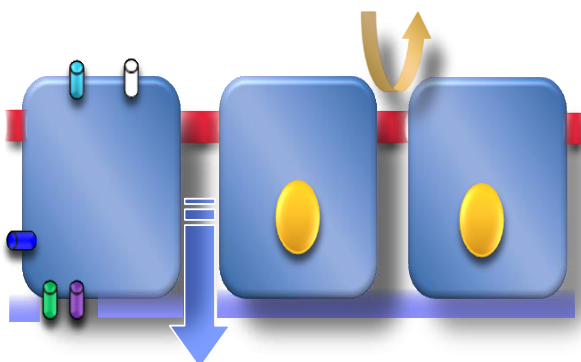


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des epi- bzw. endothelialen Transportphänotyps. Die *tight junctions* (TJs, rot) verhindern die freie Diffusion hydrophiler Substanzen durch den parazellulären Spalt (gelber Pfeil). Die Zusammensetzung der TJs ermöglicht geringe gewebsspezifische Selektivität von Epi- und Endothelien (blauer Pfeil). Die TJs erhalten durch Begrenzung der freien Diffusion von z.B. Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren (Zylinder) in der Plasmamembran die Zellpolarität aufrecht und bilden so die Grundlage für gerichtete Transportprozesse. Gelb, Zellkerne.

Der transzelluläre Transport findet in erster Linie über Ionenkanäle und -pumpen sowie ABC-Transporter, rezeptorvermittelten Transport und in geringerem Maße über freie Diffusion statt, während die parazelluläre Diffusion durch die TJs reguliert wird (Anderson und Van Itallie, 1995). Eine strenge Regulation des parazellulären Stoffaustausches ist u.a. für die Blut-Hirnschranke (BHS) von essentieller Bedeutung. Die BHS bildet die Grenze zwischen zentralem Nervensystem und dem Blutkreislauf und setzt sich maßgeblich aus Kapillarendothelzellen, Astrozyten und Perizyten zusammen (Ballabh *et al.*, 2004). Sie reguliert den Austausch von Substanzen zwischen Blut und Nervengewebe und trägt grundlegend zur Gehirnhomöostase bei. Störungen der BHS treten sekundär bei zahlreichen Krankheitsbildern wie z.B. der Alzheimerschen Erkrankung, Diabetes mellitus, Multipler Sklerose und Schlaganfall auf (Hawkins *et al.*, 2005).

1.2 Tight junctions

TJs sind Multiproteinkomplexe, die kontinuierliche Kontakte zwischen Zellen ausbilden. Die Proteinzusammensetzung der TJs variiert stark mit dem Gewebetyp (Spring, 1998) und bedingt dadurch deren Spezifität. Grundlegend können TJ-Proteine in Transmembranproteine und membranassoziierte, cytosolische Proteine eingeteilt werden. Zu den Transmembranproteinen gehören Claudine, TJ-assoziierte Marvel-Proteine (TAMPs) sowie *junctional adhesion molecules* (JAMs). Zu den membranassoziierten, cytosolischen Proteinen gehören z.B. ZO (*zonula occludens*)-1, ZO-2 und ZO-3 sowie Cingulin und ZONAB (*zonula occludens 1-associated nucleic acid binding protein*).

Strukturell erscheinen TJs in der Gefrierbruchelektronenmikroskopie als Netzwerk verzweigter Stränge (Farquhar und Palade, 1963) auf der protoplasmatischen (P-*face*) oder der extrazellulären Seite (E-*face*) der Plasmamembran (Stahelin, 1973; Abb 1.2).

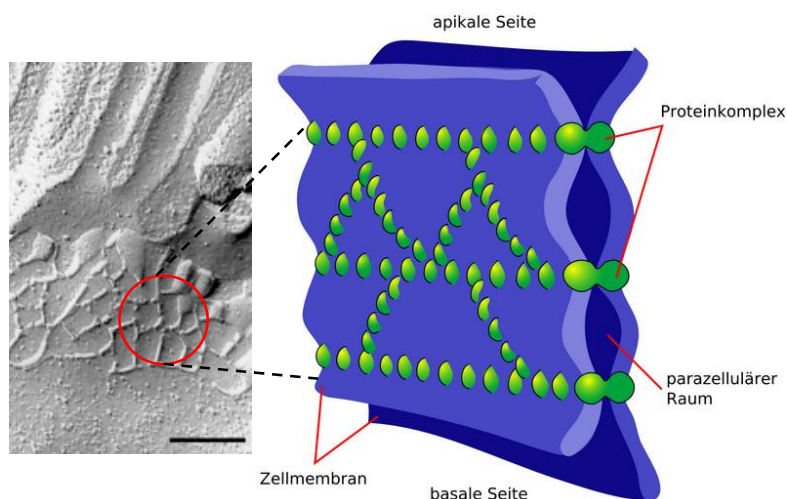


Abb. 1.2: Gefrierbruchelektronenmikroskopische (links) und schematische (rechts) Darstellung von *tight junction*-Strängen. Die schematische Vergrößerung der Stränge (roter Kreis und gestrichelte Linien; rechte Seite) stellt den strangbasierten Zusammenhalt zweier Plasmamembranen dar. Verändert nach Furuse, 2009.

Zwei Grundfunktionen des Multiproteinkomplexes TJ sind bekannt (Diamond *et al.*, 1977): Die *fence*-Funktion und die Barrierefunktion. Die *fence*-Funktion ermöglicht eine räumliche Einteilung der Plasmamembranen von Zellen in einen apikalen und einen basolateralen Bereich. Die TJ verhindert die freie Diffusion von Membranproteinen oder assoziierten Proteinkomplexen wie Ionenkanälen, Transportern und Lipiden zwischen diesen beiden Membranbereichen und schafft damit eine asymmetrische Verteilung dieser Komponenten (Dragsten *et al.*, 1981; Mandel *et al.*, 1993). So entsteht eine funktionelle Polarität von Zellen, die einen gerichteten Substanztransport für Prozesse wie z.B. Osmoregulation und Homöostase ermöglicht.

Die Barrierefunktion bestimmt die Begrenzung des parazellulären Transports von hydrophilen Molekülen durch die TJs (Ballard *et al.*, 1995). Dadurch wird z.B. das zentrale Nervengewebe u.a. vor Toxinen aus dem Blut geschützt (Tortora *et al.*, 2010). Eine wichtige Messgröße für die parazelluläre Abdichtung der TJs ist der transepitheliale oder -endotheliale elektrische Widerstand (TEER), der die parazelluläre Ionenpermeabilität wiedergibt (Powell, 1981). Er variiert zwischen verschiedenen Zellbarrieren bis zum Faktor 10^5 (Van Itallie und Anderson, 2006). Neben ihren Rollen als Begrenzer der parazellulären Diffusion und Determinanten der Zellpolarität sind die TJs an der molekularen Regulation verschiedener Prozesse, wie Zellproliferation (Tsukita *et al.*, 2008), Wundheilung (Brandner *et al.*, 2002) und Apoptose (Beeman *et al.*, 2009) beteiligt.

1.3 Proteine der *tight junctions*

1.3.1 Claudine

Claudine bilden das Rückgrat der TJs. Derzeit sind 27 Subtypen bekannt (Mineta *et al.*, 2011), die sich sequenzbasiert in klassische und nichtklassische Claudine einteilen lassen (Krause *et al.*, 2008) und molekulare Massen von 20-27 kDa aufweisen (Singh *et al.*, 2010).

Zu den klassischen Claudinen gehören die Claudine 1-10, 14, 15, 17 und 19, zu den nicht klassischen die Claudine 11, 12, 13, 16, 18 und 20-24 (Krause *et al.*, 2008). Alle Claudine bestehen aus vier Transmembrandomänen (TMD) und zwei extrazellulären sowie einer kleineren intrazellulären Schleife (Singh *et al.*, 2010). N- und C-Terminus sind sehr kurz, wobei der N-Terminus in der Regel nur aus wenigen Aminosäuren (AS) besteht. Ruffer und Gerke zeigen 2004, dass der C-Terminus der Claudine besonders wichtig für die Lokalisation in der Plasmamembran ist. Als abdichtende Mitglieder der Familie sind die Claudine 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 14 und 19 zu nennen. Demgegenüber stehen mit den Claudinen 2, 7, 10, 15 und 16

1. Einleitung

die parazellulären Porenbildner (Krause *et al.*, 2008). Die Expression dieser Claudine ermöglicht z.T. gewebsspezifische Durchlassselektivität der TJs. Die claudinsubtypspezifische Selektivität wird durch geladene AS innerhalb der extrazellulären Schleife (EZS)1 bestimmt (Colegio *et al.*, 2003; Angelow *et al.*, 2008). So kann durch Mutationen innerhalb der EZS1 von Claudin-16 ein Magnesiumverlust durch die Niere hervorgerufen werden (Simon *et al.*, 1999).

Claudine können mit sich selbst, mit anderen Claudinen und mit TAMPs interagieren (Cording *et al.*, 2013). Direkte Assoziationen von Occludin sind bisher mit den Claudinen 1, 4, 6, 9, 11, 12 und 17 nachgewiesen (Harris *et al.*, 2010). Cording *et al.* (2013) fanden Interaktionen zwischen Occludin und den Claudinen 1 und 5, wohingegen eine Occludin-Claudin-11-Interaktion nicht bestätigt werden konnte.

Die Interaktion von Claudinen innerhalb einer Plasmamembran ist auf Strukturebene die Grundlage für die Strangbildung der TJs (Blasig *et al.*, 2006). Funktionell wird durch Interaktionen von Claudinen, welche sich innerhalb gegenüberliegender Plasmamembranen befinden, die passive Diffusion durch den parazellulären Spalt reguliert. Untersuchungen mit *knockout*-Mäusen zeigen, dass Claudin-5 den parazellulären Spalt für Moleküle einer Größe von kleiner als 800 Da abdichtet (Nitta *et al.*, 2003). Claudin-5 ist neben Claudin-3 und Claudin-12 besonders in der BHS exprimiert (Morita *et al.*, 1999; Wolburg *et al.*, 2003). Die Expression von Claudin-5 erklärt die bemerkenswerte Dichtigkeit der BHS. Die interzelluläre Bindung erfolgt zumindest bei Claudin-5 Molekülen unter Beteiligung der EZS2 (Piontek *et al.* 2008).

Veränderungen in der Expression und/oder Lokalisation von Claudinen werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, was die gewebsspezifische Bedeutung einzelner Claudine unterstreicht (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Beispiele claudinassoziierter Erkrankungen

Erkrankung/Infektion mit	betroffenes Claudin (Cld)	Expression	Referenz
Morbus Crohn	Cld-2	↑	Zeissig <i>et al.</i> , 2007
	Cld-5, -8	↓	
Norovirus enterohämorrhagische <i>E.coli</i>	Cld-4, -5	↓	Talavera <i>et al.</i> , 2004
	Cld-2	↑	Roxas <i>et al.</i> , 2010
Eierstockkrebs Brustkrebs	Cld-3	↓	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	Cld-3, -4	↑	
Prostatakrebs	Cld-3, -4	↑	Kominsky <i>et al.</i> , 2004
	Cld-7	↓	Kominsky <i>et al.</i> , 2003
Darmkrebs Sterilität (♂) Taubheit	Cld-3, -4	↑	Sheehan <i>et al.</i> , 2007
	Cld-1	↓	Miwa <i>et al.</i> , 2001, de Oliveira <i>et al.</i> , 2005
Cld-1, -3, -4	↑		
	Cld-11	KO	Gow <i>et al.</i> , 1999
	Cld-11, -14	KO	Kitajiri <i>et al.</i> , 2004; Ben-Yosef <i>et al.</i> , 2003

Während es zu den Auswirkungen von Claudinveränderungen zahlreiche Arbeiten gibt, sind Studien zu strukturellen Zusammenhängen selten. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, wie die Strangorganisation der Claudinmoleküle auf molekularer Ebene funktioniert. Es wird vermutet, dass *trans*-Interaktionen die Voraussetzung für die Strangbildung der klassischen Claudine sind (Piontek *et al.*, 2011). Wahrscheinlich erfolgt die Rekrutierung der Claudine in die TJs über ZO-Adapterproteine, da eine direkte Interaktion des C-Terminus der Claudine an die PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1)-1-Domäne dieser Proteine nachgewiesen werden kann (Itoh *et al.*, 1999). Weiterhin ist ohne die Anwesenheit der ZO-Proteine eine TJ-Bildung nicht möglich, wie an Eph4-Zellen (Mausbrustepithelzelllinie), welche kein ZO-3 exprimieren, nach ZO-1- und ZO-2-*knockdown* gezeigt werden konnte (Ikenouchi *et al.*, 2007). Letztgenannte Studie beschreibt die Bildung von TJ-Strängen erst nach Transfektion von PDZ-Domänen, an die eine Membranlokalisationssequenz und eine induzierbare Dimerisierungssequenz anschlossen sind. Nach Induktion der Dimerisierung beginnen TJ-Partikel zu Strängen zu polymerisieren. Erweiterung der ZO-1-Sequenz gewährleistet die apikale Stranglokalisierung. Im Gegensatz dazu zeigt die Studie von Ruffer und Gerke (2004), dass Claudin-1 und Claudin-5 ohne das C-terminale PDZ-Bindungsmotiv in die TJs integriert werden. Dies wird dadurch unterstützt, dass die Transfektion von Claudin-1 und -2 in TJ-losen Mausfibroblasten ausreichend für die Ausbildung von TJ-Strängen ist (Furuse *et al.* 1998).

1.3.2 Occludin

1.3.2.1 Aufbau und Eigenschaften von Occludin

Das ~60-65 kDa-Protein Occludin ist das erste identifizierte transmembranale TJ-Protein (Furuse *et al.*, 1993). Es gehört zusammen mit Trizellulin und MarvelD3 zu den TAMPs. Nach Vorhersageprogrammen besitzt Occludin einen ca. 66 AS umfassenden cytosolischen N-Terminus und einen längeren cytosolischen C-Terminus (ca. 257 AS). Die vier vorhergesagten TMD (TMD1: 23 AS, TMD2: 25 AS, TMD3: 25 AS, TMD4: 22 AS) werden von zwei EZS (EZS1 = 46; EZS2 = 48 AS) und einer kleineren intrazellulären Schleife (ca. 10 AS) voneinander getrennt (Blasig *et al.*, 2011). Extra- und intrazelluläre Schleifen sowie die TMD bilden zusammen die Marvel-Domäne (*MAL and related protein for vesicle trafficking and membrane link*; Abb. 1.3). Dieser Bereich ist entscheidend für Occludins Lokalisation in der Plasmamembran und scheint die Lipidorganisation der Plasmamembran zu organisieren, wodurch deren Stabilität erhöht wird (Sanchez-Pulido *et al.*, 2002; Yaffe *et al.*,

1. Einleitung

2012). Es wird vermutet, dass u.a. in der Marvel-Domäne lokalisierte, hochkonservierte Cysteine (humane Positionen 76, 82, 148, 216, 237) an der Homodimerisierung von Occludin beteiligt sind (McCaffrey *et al.*, 2008).

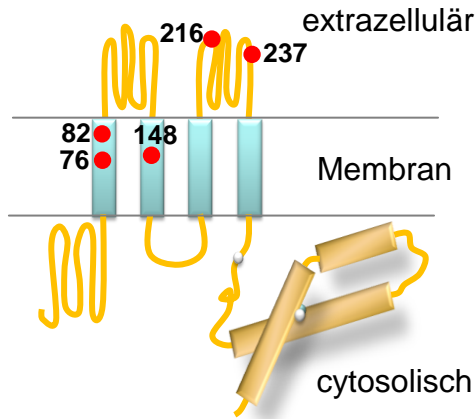


Abb. 1.3: Schema der Proteinbereiche von Occludin. Rote Punkte geben die Position der untersuchten hochkonservierten Cysteine in der Primärstruktur von Occludin an. Weiße Punkte, weitere Cysteine; blaue Zylinder, TMD; gelbe Zylinder, *coiled coil*-Domäne, schwarze Linien deuten die Plasmamembran an.

Die Sequenz der EZS1 zeichnet sich durch die Häufung der AS Glycin (19) und Tyrosin (11) aus (Nusrat *et al.*, 2005), während in der EZS2 acht Tyrosine und zwei hochkonservierte Cysteine auffallen (Abb. 1.3; Abb. A1). Struktur und Funktion der EZS1 und 2 sind unbekannt. Es wird vermutet, dass die EZS2 für die Integration von Occludin in die TJs, die parazelluläre Barrierebildung (Medina *et al.*, 2000) und die interzelluläre Assoziation von Occludinmonomeren (Wong und Gumbiner, 1997) von Bedeutung ist.

Der C-Terminus von Occludin ist notwendig für dessen Homodimerisierung (Chen *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 2009), seinen Einbau in die Plasmamembran (Matter und Balda, 1998) und die Translokation in die TJs (Mitic *et al.*, 1999; Feldman *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Bereich auch für Endocytoseprozesse von Bedeutung ist (Matter und Balda, 1998). Dies weist auf eine Funktion dieser Domäne als Regulator der intrazellulären Transportregulation hin (Nusrat *et al.*, 2000). Ein wichtiger Bereich des cytosolischen C-Terminus zeichnet sich durch eine proteolytisch stabile Region aus (Peng *et al.*, 2003), die eine *coiled coil*-Struktur bildet (Li *et al.*, 2005). Innerhalb dieser *coiled coil*-Domäne existiert ein 27 AS langer Bereich, der mit ZO-1, Proteinkinase C (PKC) ζ , c-Yes, CK2, der regulatorischen Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase sowie Connexin 26 in T84-Epithelzellen interagiert (Nusrat *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2005) und somit regulatorische Bedeutung zu haben scheint (Abb. 1.4; Tab. 1.2; Dörfel *et al.*, 2013).

Es ist bekannt, dass die cytosolischen N- und C-terminalen Bereiche Occludins verschiedene Proteine, wie z.B. ZO-1 (Furuse *et al.*, 1994), -2 (Wittchen *et al.*, 1999), -3 (Haskins *et al.*, 1998) und Cingulin (Cordenosi *et al.*, 1999) miteinander verbinden. Dies hat große Bedeutung für die Assoziation der TJs mit dem Aktin-Cytoskelett sowie ihren Zusammenbau und Erhalt

(Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003). Der C-Terminus bindet weiterhin an F-Actin und stellt somit eine direkte Verbindung der TJs mit dem Cytoskelett her (Wittchen *et al.*, 1999). Die Expression von Occludin ohne cytosolischen C-Terminus führt zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität für niedermolekulare Substanzen (Balda *et al.*, 1996).

Trotz klarer Vorstellungen über Topologie, Lokalisation und Interaktionspartner von Occludin ist seine Funktion unklar. Bislang wurden zahlreiche regulatorische Einfluss- und Modifikationsfaktoren identifiziert, die die Lokalisation, Phosphorylierung, Expression und Oligomerisierung, und somit vermutlich die Struktur und Funktion von Occludin verändern. Die wichtigsten Konzepte, die Occludin beeinflussen, sind alternative *splicing* Varianten, Proteolyse, Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Dimerisierung und pathologische Bedingungen (insbesondere Hypoxie sowie oxidativer Stress).

Eine wichtige, durch alternatives Splicing hervorgebrachte Isoform von Occludin ist die Variante TM4-, welche eine 162 bp lange Deletion in einer Region aufweist, die die TMD4 und einen Teil des cytosolischen C-Terminus codiert (Mankertz *et al.*, 2002). Aufgrund der Veränderung weist diese Isoform einen extrazellulären C-Terminus auf, wodurch die Membranlokalisation stark herabsetzt wird. Die Expression dieser Isoform ist in gestörten Zellrasen oder Zellinseln verstärkt. Dies legt die Vermutung nahe, dass TM4- in engem Zusammenhang mit Gewebsremodellierungen steht (Ghassemifar *et al.*, 2002). Eine weitere wichtige Occludinisoform ist Occludin 1B. Diese Variante wurde von Muresan *et al.* (2000) erstmals beschrieben und weist eine 193 bp umfassende Insertion auf, die eine zusätzliche N-terminale Sequenz einer Länge von 56 AS codiert. In ihrer subzellulären Verteilung unterscheidet sich 1B nicht vom Wildtyp. Es wird spekuliert, dass durch diese Isoform die Interaktion mit SH (*Src-homology*)₃-Adapterproteinen, wie z.B. den ZO-Proteinen, blockiert wird (Muresan *et al.*, 2000).

1.3.2.2 Posttranslationale Modifikationen

Die proteolytische Kontrolle über Occludin bestimmen maßgeblich Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Occludin als Substrat für beispielsweise MMP-2/-9 (Giebel *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009) und auch MMP-3 (Gurney *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2007) fungiert. MMP-9 ist ischämieaktiviert (Liu *et al.*, 2008).

Die Ubiquitinierung ist ein weiterer wichtiger Occludin-Regulationsmechanismus (Traweger *et al.* 2002). Die E3-Ubiquitin-Proteinligase Itch bindet am cytosolischen N-Terminus von Occludin und scheint an dessen Degradation beteiligt zu sein. Unter Zugabe des

1. Einleitung

Proteosomeninhibitors MG-132 ist ein verlangsamter Occludinabbau zu beobachten. Eine andere Studie beschreibt den Nachweis der Assoziation von Occludin mit Nedd4-2, einem weiteren Mitglied der E3-Ubiquitin-Ligase-Familie, per Koimmunopräzipitation (Raikwar *et al.*, 2010).

Bei der gelelektrophoretischen Analyse läuft Occludin in bis zu zehn höher laufenden Banden (Molekulargewichtsshift), die mit unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden des Proteins zusammenhängen (Sakakibara *et al.*, 1997; Andreeva *et al.*, 2001). Phosphorylierungen an Occludin werden vielfach mit veränderter TJ-Integrität assoziiert (Feldman *et al.*, 2005; Dörfel *et al.*, 2012). Gestörte Phosphorylierungsregulation von TJ-Proteinen kann mit Erkrankungen wie z.B. chronisch entzündlicher Darmerkrankung, diversen Nieren- und Lungenkrankheiten, hypoxieinduzierten Störungen (Herzinfarkt, Schlaganfall, Asthma) sowie der Karzinogenese einhergehen (Mullin *et al.*, 2004 und 2005). Verschiedene Studien schreiben der Phosphorylierung insgesamt eine große Bedeutung bei der Occludinregulation zu (Hirase *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2009; Raleigh *et al.*, 2011). Dabei haben die einzelnen Phosphorylierungsstellen (Abb. 1.4) z.T. sehr unterschiedliche Bedeutung.

Calcium switch-Experimente an MDCK-I-Zellen (Ca^{2+} -Entzug für 36 h, gefolgt von Ca^{2+} -Zugabe) zeigen nach der Calciumapplikation ansteigende Werte für Serin- und Threoninphosphorylierung (Sakakibara *et al.*, 1997). Dies ist ein Hinweis auf calciumabhängige Kinasen, die als Ursache für die zunehmende Phosphorylierung anzusehen sind. Es wird weiterhin postuliert, dass sich hochphosphoryliertes Occludin in Epithelzellen in intakten TJs anreichert (Rao *et al.*, 2009). Für Serin- und Threoninphosphorylierung (durch PKC-Isoformen oder ERK-1 und -2) ist dies gezeigt (Feldman *et al.*, 2005). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Tyrosinphosphorylierung (z.B. durch c-Src, c-Yes, Phosphoinositid-3-Kinase; Feldman *et al.*, 2005), welche z.T. durch oxidativen Stress aktivierbar ist, zu Barrieredysfunktion führt (Sheth *et al.*, 2003). Verstärkte Assoziation der Proteinphosphatase PP2A mit Occludin über einen Src-Kinase-vermittelten Mechanismus weist darauf hin, dass die Aktivität der PP2A am TJ-Zerfall in Caco-2-Zellen beteiligt ist (Sheth *et al.*, 2009). Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht über wichtige occludinregulierende Proteinkinasen und Proteinphosphatasen.

1. Einleitung

Tab. 1.2: Occludinregulierende Proteinkinasen und-phosphatasen und ihre Bedeutung

Signalweg	Lokalisation	Phosphoryl.	Expression	Barriere	Zellen	Referenz
Proteinkinasen						
pan-PKC aktiv.				↓	HMEC-1	Park <i>et al.</i> , 1999
pan-PKC inhib.				∅	HMEC-1	Park <i>et al.</i> , 1999
cPKC	Membran ↑	↑			MDCK-II	Andreeva <i>et al.</i> , 2001
	Membran ↓	↓		↑	MDCK-II	Andreeva <i>et al.</i> , 2006
		Ser ²³⁸ ~P			MDCK-II	Andreeva <i>et al.</i> , 2001
nPKC	Membran ↑	↑		↑	MDCK-II	Andreeva <i>et al.</i> , 2006
nPKCη		↑		↑	Caco-2	Suzuki <i>et al.</i> , 2009
MAPK inhib.				∅	HMEC-1	Park <i>et al.</i> , 1999
PKG inhib.				∅	HMEC-1	Park <i>et al.</i> , 1999
ERK1/2 inhib.			↓	↓	BEC	Krizbai <i>et al.</i> , 2005b
	TJ-Strang ↓		↓	↓	rAEC	Cohen <i>et al.</i> 2010
			↓	↓	MDCK-II	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
ERK	Membran ↑			↑	Caco-2	Basuroy <i>et al.</i> , 2006
Raf-1 transf.	Nicht detekt.		↓	↓	Pa4	Wang <i>et al.</i> , 2005
SV-40	Membran ↓		↓		MDCK	Nunbhakdi-Craig <i>et al.</i> , 2003
CK1	Membran ↓				MCF-7	Dupre-Crochet <i>et al.</i> , 2007
CK2	Membran ↓				Caco-2	Raleigh <i>et al.</i> , 2011
c-Yes	Membran ↑			↑	MDCK-II	Chen <i>et al.</i> , 2002
ROCK				↓	COS-7	Yamamoto <i>et al.</i> , 2008
Akt1 (indirekt)	Membran ↓			↓		Sundstrom <i>et al.</i> , 2009
c-Src	Membran ↓				Rat-1	Elias <i>et al.</i> , 2009
					MDCK-II	
PI3K	Membran ↓			↓	Caco-2	Basuroy <i>et al.</i> , 2003
	Membran ↓			↓	Caco-2	Sheth <i>et al.</i> , 2003
GSK-3	Membran ↑		↓	↓	SK-CO15	Severson <i>et al.</i> , 2010
Proteinphosphatasen						
PP1	Membran ↓	↓ Ser		↓	Caco-2	Seth <i>et al.</i> , 2007
PP2A	Membran ↓	↓ Thr		↓	Caco-2	Seth <i>et al.</i> , 2007
DEP-1		↓ Tyr		↑	MDCK-II	Sallee <i>et al.</i> , 2009

inhibit., inhibiert; aktiv., aktiviert; Phosphoryl., ~P, Phosphorylierung; ∅, unverändert; ↑, Zunahme; ↓, Abnahme; transf, transfiziert; SV, *simian vacuolating virus*;

PK, Proteinkinase; MAPK, mitogenaktivierte Proteinkinase; ERK, extrazellulärsignalregulierte Kinase; Raf, protoonkogene Ser/Thr-Kinase; CK, Caseinkinase; c-Yes, nichtrezeptorische Tyrosinkinase; ROCK, Rho assoziierte Kinase; Akt, Proteinkinase B; Src, Src-Kinase; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; GSK, Glycogensynthasekinase; PP, Proteinphosphatase; DEP, *density enhanced protein tyrosine phosphatase*;

HMEC, humane Hautgefäßendothelzellen; BEC, murine primäre Gehirnendothelzellen; rAEC, primäre Rattenalveolarepithelzellen; Pa4, Rattenspeicheldrüsenepithelzellen; MDCK, *Madin-Darby canine kidney*; Caco, humane Colonkarzinomzelllinie; MCF-7, humane Brustadenokarzinomzelllinie; COS-7, fibroblastenähnliche Zelllinie von *Cercopithecus aethiops*; Rat-1; mesenchymale Stammzellen der Ratte; SK-CO15, humane Colonepithelzelllinie.

Die zahlreichen Kinase-Interaktionsdomänen, v.a. an bzw. nahe der C-terminalen *coiled coil*-Domäne von Occludin (murines Occludin⁴⁰⁶⁻⁵²¹; homolog zur ELL-Domäne im humanen Occludin⁴¹⁶⁻⁵²²), zeigen dessen wichtige Bedeutung als Phosphoprotein (Abb. 1.4; Dörfel *et al.*, 2012). Die Phosphorylierung des hochkonservierten Motifs 397-YETDYTT-405 (Tyrosin398 und -402 in humanem Occludin) durch c-Src führt zu reduzierter Bindung an

1. Einleitung

ZO-1 und damit zu Relokalisation von Occludin ins Cytosol sowie zu Barrieredysfunktion (Elias *et al.*, 2009).

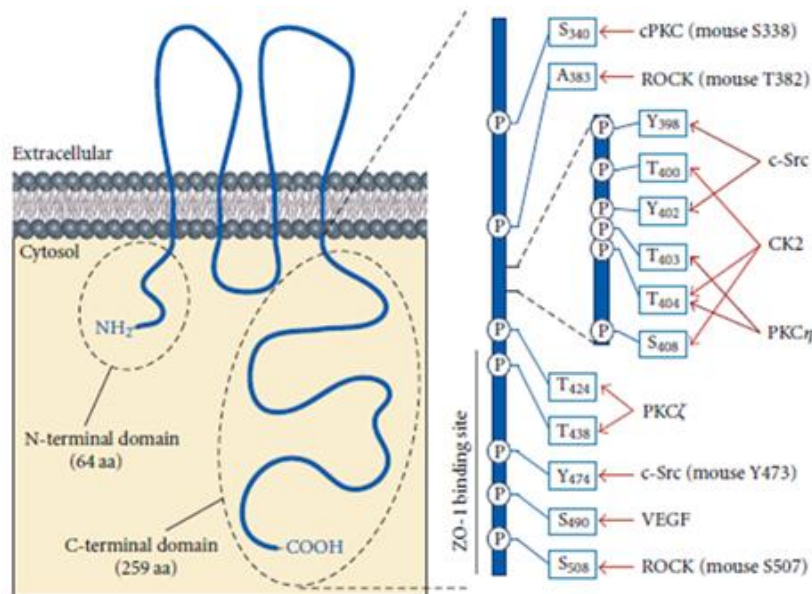


Abb. 1.4: Phosphorylierungsstellen am cytosolischen, C-terminalen Bereich von Occludin. P, Phosphorylierung; PKC, Proteinkinase C; VEGF, vascular endothelial growth factor; ROCK, rho-assoziierte Kinase; c-Src, src-Kinase. Aus: Dörfel *et al.*, 2011.

Die Caseinkinasen CK1 und CK2 sind v.a. in Eukaryoten exprimierte Serin-Threoninkinasen (Dörfel *et al.*, 2009/2013). Beide interagieren mit dem C-terminalen Bereich Occludins kurz vor der *coiled coil*-Domäne. Darüber hinaus ist CK1 fähig, AS des cytosolischen N-Terminus von Occludin zu phosphorylieren (Cordenosi *et al.*, 1997; Cordenosi *et al.*, 1999).

Die CK2 besteht aus zwei regulatorischen β -Untereinheiten (β und β') sowie aus zwei enzymatisch aktiven α -Untereinheiten (α und α'). Letztgenannte phosphorylieren das Konsensussequenzmotif S/T-X₁₋₂-E/D. Die CK2 kann sowohl ATP als auch GTP als Phosphatdonor verwenden. Lange waren als Substrate der CK2 in Occludin nur die Reste Threonin375 und Serin379 der *Xenopus laevis* Occludinsequenz (Cordenosi *et al.*, 1999) und die Reste Threonin403 und Serin407 der Mausequenz von Occludin (Smales *et al.*, 2003) bekannt. Erst vor einigen Jahren wurde mit Threonin400 (human) ein drittes Substrat der CK2 identifiziert, welches sich auch in den Maus- und Xenopussequenzen wiederfindet (Dörfel *et al.*, 2009).

Die CK2 reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, wie z.B. Proliferation, Apoptose, Genregulation und circadianen Rhythmus (St. Denis und Litchfield, 2009). Außerdem wird sie bei zahlreichen Krebsarten verstärkt exprimiert und reguliert Signalkaskaden wie z.B. Wnt- und NF κ B (Dominiguez *et al.*, 2009; Trembley *et al.*, 2009). Ein direkter Zusammenhang zwischen Hypoxie und CK2-Aktivierung ist belegt (Pluemsampant *et al.*, 2008). Die Konsequenzen der CK2-Phosphorylierung für Occludin und die TJs sind unbekannt.

1.3.2.3 Krankheitsrelevanz von Occludin

Faktoren und Stimuli, welche die Serin-, Threonin- oder Tyrosinphosphorylierung Occludins beeinflussen, können die TJs regulieren. Darunter sind beispielsweise Cytokine (Capaldo und Nusrat, 2009), *vascular endothelial growth factor* (VEGF; Murakami *et al.*, 2009), veränderte Redoxbedingungen (Blasig *et al.*, 2011), oxidierte Phospholipide (De Maio *et al.*, 2006) und Gallensäuren (Raimondi *et al.*, 2008). Die Abb. 1.5 gibt einen Überblick über derartig gesteuerte Zellprozesse, die sich auf Occludin auswirken.

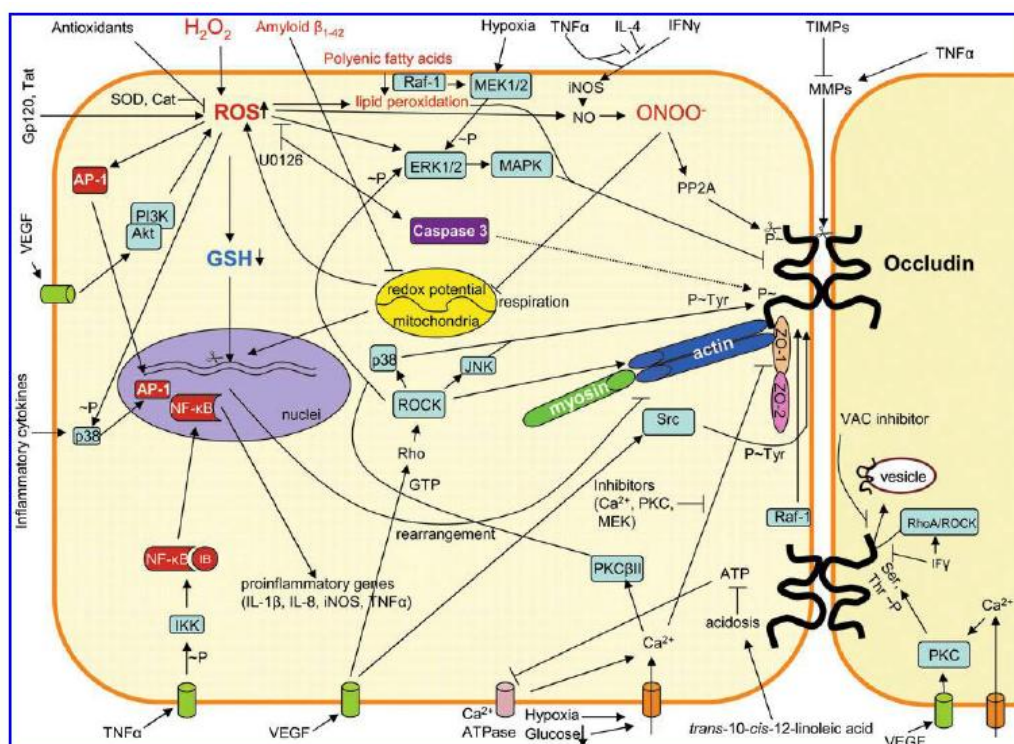


Abb. 1.5: Schematische Zusammenfassung einiger, unter Beteiligung von Occludin stehender, redoxabhängiger Signalkaskaden und ihrer Wechselwirkungen. TNF, tumor necrosis factor; IL, Interleukin; IFN, Interferon; ROS, reaktive oxigene Spezies; GSH, reduziertes Glutathion; PKC, Proteinkinase C; AP-1, Aktivatorprotein 1; NF- κ B, nuclear factor κ B; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; Rho, Ras-Homolog; p38, eine mitogenaktivierte Proteinkinase; ROCK, Rho-assoziierte Kinase; Src, Src-Kinase; ~P, Phosphorylierung; iNOS, induzierbare NO-Synthase; VEGF, vascular endothelial growth factor; VAC, vesicular apical complex; TIMPs, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs); MAPK, mitogenaktivierte Proteinkinase; MEK, MAP/ERK-Kinase; ERK, extrazelluläre signalregulierte Kinase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; IKK, inhibitorische κ B Kinase; IB, inhibition unit of NF- κ B; Akt, Proteinkinase B; Raf-1, MAPK-Kinase-Kinase-Kinase. Hellblaue Kästchen, Kinasen; rote Kästchen, Transkriptionsfaktoren; grüne Zylinder, Rezeptoren; orange Zylinder, Ionenkanäle; UO126, MEK-Inhibitor; Gp120, Hüllprotein des human immunodeficiency virus (HIV); Tat, transcription-activating factor of HIV; SOD, Sumeroxid-Dismutase; Cat, Katalase; PP2A, Proteinphosphatase 2A. Aus: Blasig *et al.*, 2011.

Veränderte Redoxbedingungen wie Hypoxie (Maraldi *et al.*, 2010) oder mechanische Belastung von Zellen (Gatti *et al.*, 2008) können zur Bildung von reaktiven oxigenen Spezies (ROS) wie z.B. Superoxid-Anionen oder Wasserstoffperoxid führen. Diese ROS können sich z.B. über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. Aktivatorprotein-1) oder die

1. Einleitung

Modulation des GSH/GSSG-Verhältnisses auf die Genregulation auswirken (Lu, 2009). Es sind auch Auswirkungen der ROS auf occludinregulierende Kinasen, wie z.B. MAPK (Cohen *et al.*, 2010) und ERK1/2 (Saenz-Morales *et al.*, 2009; Jamaluddin *et al.*, 2010) bekannt (Abb. 1.5). In Gehirndothelzellkulturen führen ROS nach Hypoxie/Reoxigenierung unter Beteiligung von MAPK zu reduzierter Abundanz von Occludin und geringerer parazellulärer Dichtheit (Krizbai *et al.*, 2005b). Konsequenzen der redoxstressbedingten Aktivierung von ERK1, -2 und p38 sind verminderte Occludinexpression sowie eine verringerte Barrierefunktion. Raf-1, ein *downstream*-Effektor des ras-Onkogens, welches Zellproliferation und -differenzierung kontrolliert, mobilisiert den redoxregulierten MAPK(ERK)- Signalweg (Cobb *et al.*, 1994; Abb. 1.5).

Es gibt jedoch auch antagonistisch wirkende Signalwege mit kompensatorischen Funktionen (Andreeva *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010). Hemmung von ERK1, -2 und p38 führt z.B. zur Wiederherstellung der Barrierefunktion (Krizbai *et al.*, 2005a; Gonzalez *et al.*, 2009). Enzyme wie Catalase oder Superoxid-Dismutase (SOD) schützen Zellen vor Auswirkungen von ROS (Abb. 1.5). Mutationen der SOD werden mit amylothropher Lateralsklerose in Verbindung gebracht (Zhong *et al.*, 2008). Verringerung der Expressionslevel von ZO-1, Claudin-5 und Occludin führen bei dieser Erkrankung zum Zusammenbruch der TJs an der Blut-Rückenmarkschranke (Zhong *et al.*, 2008). Antioxidanzien inhibieren ROS-basierte Effekte indem sie als Radikalfänger wirken (Tempol; Lochhead *et al.*, 2010), oxidative Kettenreaktionen unterbrechen oder radikalbildende Enzyme hemmen (Blasig *et al.*, 2011).

Untersuchungen belegen, dass Occludin auf die Freisetzung von Cytokinen wie beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF) α oder Interferon (IFN) γ reagiert. Das Protein wird internalisiert (Ahdieh *et al.*, 2001; Bruewer *et al.*, 2005). Die erwähnten Cytokine werden bei Entzündungsreaktionen von Immunzellen freigesetzt, um die Transmigration durchs Kapillarendothel zu gewährleisten (Kucharzik *et al.*, 2001). Das Zusammenwirken von oxidativem Stress und Cytokinproduktion bzw. -freisetzung sind für eine Reihe neurologischer Entzündungen (Coisne *et al.*, 2011) und Darmentzündungen (John *et al.*, 2011), sowie Tumoren (Castello *et al.*, 2010) bekannt. Dieses Zusammenspiel wird z.B. durch den Einfluss cytokinaktivierter Faktoren auf das intrazelluläre GSH/GSSG-Verhältnis (Peng *et al.*, 2010) oder durch die Abhängigkeit der Interleukin-12-Produktion vom Redoxgleichgewicht der Zelle (Adam *et al.*, 2010) deutlich.

Die IFN γ -basierte Internalisierung von Occludin funktioniert über Macropinozytose und ist nicht Clathrin- oder Caveolae-vermittelt (Bruewer *et al.*, 2005). Behandlung mit IFN γ führt zur Aktivierung der Rho-GTPase und zur Hochregulation von ROCK, wodurch die Endocytose in

aktinummantelte vesikuläre apikale Kompartimente erfolgt (Utech *et al.*, 2005; Abb. 1.5). TNF α führt zur MMP9-vermittelten Occludindegradation und zum Abbau der TJs in cEND-Zellen (Förster *et al.*, 2007).

VEGF, dessen Expression unter Hypoxie aktiviert wird (Schoch *et al.*, 2002), führt zu verstärkter ROS-Produktion (Maraldi *et al.*, 2010) und damit ebenfalls zum Verlust der Barrierefunktion der TJs, der oftmals in Verbindung mit reduzierter Occludinexpression auftritt (Bauer *et al.*, 2010). In primären Retinaepithelzellen kommt es nach VEGF-Administration zur PKC-vermittelten Occludinphosphorylierung (Harhaj *et al.*, 2006). Mäuse, die normobarischer Hypoxie ausgesetzt sind, zeigen reduzierte Occludinexpression bei erhöhter Permeabilität der Gehirngefäße. VEGF-Hemmung hemmt die Ausbildung der Permeabilität unter diesen Bedingungen (Bauer *et al.*, 2010). Neben reduzierter Expression und Barrierefunktion finden Wang *et al.* (2001) in primären BMEC-Zellen auch eine MAPK-bedingte Relokalisation von Occludin ins Cytosol durch VEGF.

In Zellkulturversuchen bei Hypoxie, eines Typs pathologischer Bedingungen bei Erkrankungen wie Höhenkrankheit (Moore *et al.*, 1985) oder Asthma (Ahmad *et al.*, 2012), zeigt sich, dass Occludin als erstes der getesteten membranständigen TJ-Proteine die TJs verlässt und ins Zellinnere relokalisiert (Brown und Davis, 2002). Brown und Davis beschreiben drei Szenarien, die auf Hypoxie folgen (vgl. Abb. 1.5): (i) Hypoxie führt zu einer direkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. TNF α , wodurch die Expression von TJ-Proteinen reguliert wird. (ii) Hypoxie führt zur Produktion von ROS, die wiederum Cytokine aktivieren (z.B. NF κ B), welche in der Lage sind die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu regulieren. In der Regulation der Expression von TJ-Proteinen liegt dann die Ursache der veränderten TJ-Architektur. (iii) Unter Hypoxie kommt es zu einem Anstieg der Calciumkonzentration im Zellinneren. Dies wirkt sich auf die Regulation calciumabhängiger Proteinkinasen (z.B. aus der PKC-Familie) aus (Brown und Davis, 2002). Studien anderer Autoren belegen ebenfalls die im Vergleich zu Claudinen stärker ausgeprägte Sensitivität Occludins gegenüber oxidativem Stress (Hashimoto *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2009). Durch die redoxabhängigen Veränderungen der Expression (Brown und Davis, 2005), Lokalisation (Caraballo *et al.*, 2011) und Oligomerisierung (Walter *et al.*, 2009 und Lochhead *et al.*, 2010) gilt Occludin als Indikator für oxidativen Stress, wie er nach der Induktion von Schlaganfällen, bei verschiedenen Infektionen, Entzündungen und zahlreichen Krebsformen auftritt (Förster *et al.*, 2008; Blasig *et al.*, 2011).

Neben den erwähnten indirekten Effekten der Hypoxie ist auch eine direkte Hypoxieantwort Occludins denkbar (Blasig *et al.*, 2011). Bisher ist über die molekulare Basis der

1. Einleitung

Redoxsensitivität von Occludin nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die beiden hochkonservierten Cysteine²¹⁶ und ⁻²³⁷ der EZS2 (Abb. A1; Abb. 1.3) durch Ausbildung einer intramolekularen, nach außen abgeschirmten, Disulfidbrücke eine Bindungsstruktur bilden (McCaffrey *et al.*, 2008; Blasig *et al.*, 2011; Günzel und Yu, 2013). Diese strukturelle Organisation könnte eine Basis für die Redoxsensitivität von Occludin sein.

Die zahlreichen Occludinmodifikatoren (z.B. Ubiquitinierung, Proteolyse, Phosphorylierung) und die große Anzahl an Interaktionspartnern sind verantwortlich dafür, dass Veränderungen von Occludin oder dessen homologen oder heterologen Interaktionen vielfältige physiologische Veränderungen nach sich ziehen könnten. Die Inkubation von occludinexprimierenden Zellen mit einem synthetischen Peptid der EZS1 von Occludin (Occ⁹⁰⁻¹⁰³) führt zu signifikant erhöhter Mannitol- (Tavelin *et al.*, 2003) und Dextranpermeabilität (Everett *et al.*, 2006). Weiterhin resultiert die Administration dieses Peptides in primären humanen Luftröhrenepithelzellen in reduzierten TEER-Werten und Relokalisation von Occludin ins Cytosol (Everett *et al.*, 2006). Occludin^{100-108/109} (EZS1, Hühnchen) führt zu verlangsamter Wiederherstellung der TJ-Barriere von A6-Zellen nach vorhergehendem Ca²⁺-Entzug (Barriereverlust) und anschließender Ca²⁺-Zugabe (Lacaz-Vieira *et al.*, 1999). Das EZS2-abgeleitete Peptid Occ¹⁸⁴⁻²²⁷ führt zu verminderter Barrierefunktion der TJs in EpH4-Zellen (murines Brustdrüsenepithel; Vietor *et al.*, 2001). Wong und Gumbiner (1997) beobachten ebenfalls die Abnahme des TEER-Wertes und reduzierte TJ-Lokalisation von Occludin in *Xenopus*-Nierenepithelzellen nach Inkubation mit dem gleichen Peptid. Das EZS1 Peptid zeigt in beiden letztgenannten Untersuchungen keine Wirkung. Diese Resultate lassen auf eine Abdichtungsfunktion von Occludins EZS2 schließen.

Allerdings weisen die Untersuchungen zum Einfluss Occludins auf die transzelluläre Dichtheit keine konsistenten Ergebnisse auf: Balda *et al.* (1996) messen erhöhte TEER-Werte nach Überexpression von Occludin in MDCK-II-Zellen, während Saitou *et al.* (1998) keine TEER-Veränderungen oder Auswirkungen auf die Zellpolarität während der Differenzierung von occludindefizienten Stammzellen in Epithelien beobachten. In MDCK-II-Zellen führt *knockdown* von Occludin zu veränderter Claudinorganisation und somit zu reduzierten TEER-Werten (Yu *et al.*, 2005). Ähnliche Ergebnisse liefern vergleichbare Experimente in Keratinocyten (Yamamoto *et al.*, 2008). Die Arbeit versucht dazu beizutragen, die Rolle Occludins für den transzellulären Widerstand aufzuklären und die Permeationsregulation durch Occludin besser zu verstehen.

1. Einleitung

Die Expression von Occludin in TJ-losen L-Fibroblasten führt zur Ausbildung kurzer Stränge und nach Transfektion von Occludin in Claudin-1-enthaltende Zellen werden beide Proteine in die Strangbildung integriert (Furuse *et al.*, 1998). Kuwabara *et al.* (2001) kommen zu folgenden Ergebnissen: Transfektion von Occludin in occludinfreie Rattenlungenendothelzellen verändert die parazelluläre Permeabilität nicht. Das Protein ist in der TJ-Ebene lokalisiert. Weiterhin ist die Akkumulation von Occludin an der basolateralen Plasmamembran positiv mit der Akkumulation von Aktin korreliert. Umgekehrt führt Depolymerisation von Aktin zur Internalisierung von Occludin (Kuwabara *et al.*, 2001). In Occludin-*knockdown*-Mäusen werden keine morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen detektiert. Dafür zeigen diese Tiere chronische Entzündungen, ein verzögertes Wachstum, Kalziumanreicherungen im Gehirn, Unfruchtbarkeit bei männlichen und Saugverweigerung bei Muttertieren (Saitou *et al.*, 2000). Diese Befunde sind Hinweis auf indirekte, regulatorische Effekte von Occludin auf die TJs (Tsukita *et al.*, 1999).

Sowohl der Kontakt mit Antigenen und exogenen Makromolekülen (Stebens *et al.*, 2004) als auch hypoxische Bedingungen (Hartmann *et al.*, 2000) führen zu Entzündungsreaktionen. Entzündungen werden mit Störungen der Morphologie und Funktionalität von TJs assoziiert (Schulzke *et al.*, 2009). Bei Infektionen mit viralen und bakteriellen Erregern (Tab. 1.3) oder unter pathologischen Bedingungen (z.B. Hypoxie; Tab. 1.3) setzen barrierebildende Zellen und Immunzellen (T-Zellen, Makrophagen) Cytokine frei um evtl. vorhandene Pathogene zu bekämpfen. Diese Cytokine können die Genregulation von Occludin beeinflussen (Ahdieh *et al.*, 2001; Förster *et al.*, 2007) und zu vermehrter ROS-Produktion führen (Yang *et al.*, 2007), die sich über verschiedene Signalwege auf Occludin auswirken können (Abb. 1.5). Weiterhin führen Cytokine zu vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle aus dem Extrazellularraum (Ramadan *et al.*, 2011), was seinerseits die auf Occludin wirkenden PKCs in ihrer Funktion reguliert. Kürzlich wurde gezeigt, dass Occludin eine wichtige Rolle bei der cytokininduzierten Regulation der TJ-Barriere spielt (Van Itallie *et al.*, 2010).

Neben der entzündungsauslösenden Eigenschaft von hypoxischen Bedingungen (Grocott *et al.*, 2009) sind hypoxische Bedingungen auch Konsequenzen von entzündlichen Prozessen. Lokale hypoxische Bedingungen entstehen bei vermindertem Blutfluss (Zentrum von Tumoren; Gatenby *et al.*, 2004) und/oder wenn durch den Blutfluss nicht genügend Sauerstoff angeliefert werden kann, wie durch Wachstum und/oder Infiltration von Immunzellen nötig wäre (Murdoch *et al.*, 2005). Relokalisation von Occludin ins Cytosol und Störungen der Barrierefunktion sind die Haupteffekte von entzündungsauslösenden Infektionen und pathologischen Bedingungen (Tab. 1.3).

1. Einleitung

Tab. 1.3: Occludinassozierte Erkrankungen, Infektionen und pathologische Bedingungen

Störung durch	Lokalisation	Expression	Barriere	Organ/Zellen	Referenz
<i>Escherichia coli</i> pathovar	Membran ↓		↓	T84	McNamara <i>et al.</i> , 2001
<i>Clostridium difficile</i>	Membran ↓	∅	↓	T 84	Nusrat <i>et al.</i> , 2001
<i>Vibrio cholerae</i>	∅	Verdau		MDCK-I	Wu <i>et al.</i> , 2000
<i>Helicobacter pylori</i>	Membran ↓		↓	Magen (murin)	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhesus rotavirus</i>	Membran ↓		↓	Caco-2	Dickman <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichinella spiralis</i>	Cytosol	↓ Verdau	↓	Darm (murin)	McDermott <i>et al.</i> , 2003
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Membran ↓		↓	HBMEC	Chen <i>et al.</i> , 2003
Collagenous colitis		↓	↓	Colon (human)	Bürgel <i>et al.</i> , 2002
Inflammatory bowel disease	Membran ↓	↓	↓	Colon (human)	Kucharzik <i>et al.</i> , 2001
Chemical colitis	Membran ↓		↓	Ileum (Ratte)	Fries <i>et al.</i> , 1999
Irritable bowel syndrom	Membran ↓	↓	↓	Colon (human)	Coeffier <i>et al.</i> , 2010
Pankreatitis	Cytosol	↓		Pankeas (murin)	Schmitt <i>et al.</i> , 2004
HIV	Membran ↓	↓	↓	Hirn (human)	Dallasta <i>et al.</i> , 1999
		↓	↓	T84	Nazli <i>et al.</i> , 2010
Gp120, Tat (HIV-Proteine)	Cytosol	↓	↓	rAEC	Lassiter <i>et al.</i> , 2009
Multiple Sklerose		↓	↓	SVEC	Minagar <i>et al.</i> , 2003
	Cytosol	↓	↓	RBE4	Proia <i>et al.</i> , 2009
Hausstaubmilbenallergie	Membran ↓	Verdau	↓	16HBE14o	Wan <i>et al.</i> , 1999
Haustaubmilbenserinproteasen	Membran ↓	Verdau	↓	16HBE14o	Wan <i>et al.</i> , 2001
Synovialsarkom	∅	↓		Gewebe	Billings <i>et al.</i> , 2004
Prostatakarzinom		↓		Gewebe	Busch <i>et al.</i> , 2002
Endometrialkarzinom	Membran ↓	↓		Endometrium	Toboika <i>et al.</i> , 2004
hemorrhagischer Schock		↓	↓	Rattenhirn	Krizbai <i>et al.</i> , 2005a
Hypoxämie	Membran ↓	↓	↓	Hirn (murin)	Bauer <i>et al.</i> , 2010
Hypoxämie/Reoxigenierung		↓	↓	Hirn (Ratte)	Witt <i>et al.</i> , 2003
Ischämie	Membran ↓	↓	↓	Hirn (Ratte)	Liu <i>et al.</i> , 2008
Ischämie/Reperfusion	Cytosol		↓	Colon (Ratte)	Li <i>et al.</i> , 2009
Hypoxie (O ₂ -Chelator)			↓	HMEC-1	Park <i>et al.</i> , 1999
Hypoxie/Reoxigenierung		↓	↓	Gehirnendothel	Krizbai <i>et al.</i> , 2005b

T84, Zelllinie vom humanen Colonadenom; HBMEC, humane Gehirnkapilarendothelzellen; SVEC, immortalisierte murine Venenendothelzellen; RBE4, Rattengehirnendothelzelllinie 4; 16HBE14o, immortalisierte humane Bronchialepithelzellen; ↓, Abnahme; ∅, unverändert. Weitere Abkürzungen: Tab. 1.2.

Die Verbindung zwischen Occludins Hypoxiesensitivität und den Konsequenzen der Veränderung Occludins unter dieser Bedingung für die gesamte TJ, machen eine Transduktorfunktion von Occludin zwischen Hypoxie/reduzierenden Bedingungen und der TJ-Integrität denkbar. Auf die BHS bezogen wäre es damit möglich, dass der occludinvermittelte Zerfall der TJs bei der Entstehung von Hirnödemen bei Schlaganfall eine Rolle spielen könnte.

1.3.3 Trizellulin

Neben Occludin ist Trizellulin ein weiteres Mitglied der TAMP-Familie. Es wurde 2005 (Ikenouchi *et al.*) identifiziert. Die Sequenzhomologie zu Occludin beträgt rund 30%. Der auffälligste Unterschied zwischen beiden Proteinen ist der cytosolische N-Terminus. Dieser ist bei Trizellulin mit 194 AS erheblich länger als bei Occludin (66 AS). Es gibt Hinweise darauf, dass der N-Terminus von Trizellulin die Lokalisation in der Plasmamembran bestimmt, während der C-Terminus die typische Lokalisation Trizellulins in Dreizellkontakten steuert (Westphal *et al.*, 2010).

Occludin und Trizellulin scheinen auf zellulärer Ebene in Zweizellkontakten füreinander kompensierbar zu sein (Raleigh *et al.*, 2010). So findet sich Trizellulin in Occludin-*knockdown*-Zellen an bizellulären Kontakten. Es wird vermutet, dass Occludin die trizelluläre Lokalisation von Trizellulin durch Verdrängung aus den bizellulären Bereichen unterstützt (Ikenouchi *et al.*, 2008). Trizellulin scheint dort die Permeation von Makromolekülen zu beeinflussen (Krug *et al.*, 2009). Phänotypisch spielen Veränderungen von Trizellulin beim Hörprozess eine wichtige Rolle. Durch Punktmutationen in Trizellulin (K443D, R500X) wird Taubheit verursacht. Eine direkte Bindung zu ZO-1 ist auch für dieses Protein nachweisbar. Die Mutanten, welche Taubheit erzeugten, werden ebenfalls mit einer reduzierten Bindung an ZO-1 in Verbindung gebracht (Riazuddin *et al.*, 2006).

1.3.4 MarvelD3

Mit ca. 45 kDa ist MarvelD3 das leichteste der Proteine der TAMP-Familie. Isoform 1 besteht aus 410, Isoform 2 aus 401 und Isoform 3 aus 148 AS.

MarvelD3 wurde 2009 von Steed *et al.* identifiziert und als vorerst letztes in die Familie der TAMPs aufgenommen. Auch MarvelD3 hat vier TMD, die durch zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife voneinander separiert werden. Im Gegensatz zu Occludin ist bei MarvelD3 der cytosolische C-Terminus mit 20 AS in Isoform 1 und 18 AS in Isoform 2 wesentlich kürzer als der cytosolische N-Terminus (226 AS in Isoform 1; Steed *et al.*, 2009).

Ko-Immunopräzipitationsexperimente zeigen keine direkte Interaktion zwischen MarvelD3 und ZO-1. Ursache ist vermutlich der extrem kurze C-terminale Bereich des Proteins (Raleigh *et al.*, 2010). Lokalisationsexperimente weisen Kolo-kalisation zwischen MarvelD3 und Occludin nach (Steed *et al.*, 2009). Außerdem deutet die Kopräzipitation von MarvelD3 mit Occludin und Trizellulin auf Interaktionen mit beiden Proteinen hin (Raleigh *et al.*, 2010).

Eine Reduktion von MarvelD3 zeigte keinen Einfluss auf die Bildung der TJs. Das Protein selbst bildet keine Stränge (Raleigh *et al.*, 2010). Auf einen Einfluss von MarvelD3 auf die parazelluläre Ionenpermeabilität weisen TEER-Experimente von Steed *et al.* (2009) hin, die einen Anstieg des TEER-Wertes nach Verminderung der Expression von MarvelD3 durch si-RNA zeigten.

1.3.5 Weitere *tight junction*-assoziierte Proteine

Außer den bisher vorgestellten TJ-Proteinen gibt es noch zahlreiche weitere, die an der Bildung der TJs beteiligt sind. Als Transmembranproteine sind z.B. noch die JAMs zu nennen, von denen es fünf Varianten gibt (JAM A, JAM B, JAM C, JAM-like und IGSF5). JAMs sind von der Struktur der extrazellulären Domäne her gesehen antikörperähnliche Proteine mit einer TMD (Martin-Padura *et al.*, 1998). Ihr Molekulargewicht liegt bei ca. 130 kDa. Am intrazellulären C-Terminus weisen die JAMs eine ZO-1 Bindungsstelle auf (Itoh *et al.*, 2001; Ebnet *et al.*, 2003). Weiterhin interagieren sie mit den Proteinen Par-3 (Ebnet *et al.*, 2001), Cingulin, Occludin (Bazzoni *et al.*, 2000) und Afadin (Ebnet *et al.*, 2000). JAMs unterstützen die Integration von Occludin in die TJs. Es kommt zu verstärkter Anreicherung von Occludin bei gleichzeitiger Expression von JAMs (Bazzoni *et al.*, 2000). Für JAM C ist nachgewiesen, dass es eine wichtige Rolle bei der Lymphocytenmigration durch das Kapillarendothel spielt (Martin-Padura *et al.*, 1998). Weiterhin scheinen JAM A und CAR (Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor), ebenfalls ein Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie (Tomko *et al.*, 1997), eine Rolle bei der Verdichtung des parazellulären Spaltes zu spielen. Es ist gezeigt, dass diese Proteine den TEER beeinflussen können (Liu *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Mandell *et al.*, 2005). CAR kolokalisiert und kopräzipitiert in Epithelzellen mit ZO-1 und verfügt über ein C-terminales Bindungsmotiv, welches wahrscheinlich mit den PDZ-Domänen oder der SH3-Domäne von ZO-1 interagiert (Cohen *et al.*, 2001).

Die bedeutendsten cytosolischen, membranassoziierten TJ-Moleküle sind die ZO-Proteine. Von dieser Familie sind derzeit die Mitglieder ZO-1 bis ZO-3 bekannt. ZO-1 war 1986 das erste entdeckte Protein der TJs (Stevenson *et al.*, 1986). Die Familie der ZO-Proteine ist auch als membranassoziierte guanylatkinaseähnliche Proteine (MAGUK, *membrane associated guanylat kinase*) bekannt. MAGUK-Proteine bestehen aus 1-3 PDZ-Domänen, einer SH3-Domäne und einer guanylatkinaseähnlichen Domäne (GuK-Domäne) ohne enzymatische Aktivität (Anderson, 1996; Olsen und Brecht, 2003). Die Bedeutung der ZO-Proteine liegt in

ihrer Adapterfunktion. Sie bilden Verbindungen zwischen Membranproteinen der Zellkontakte untereinander, zum Cytoskelett und zu Proteinen der Signalverarbeitung (z.B. ZONAB; Itoh *et al.*, 1999). Sie werden mit der Rekrutierung von Membranproteinen an die *adherens junctions* und TJs in Verbindung gebracht (Ikenouchi *et al.*, 2007). Die Lokalisation der Proteine ZO-1 und ZO-2 beschränkt sich in Zellen, die keine TJs aufweisen und in Zellen, die chemischem oder mechanischem Stress unterliegen auf den Zellkern (Gottardi *et al.*, 1996; Islas *et al.*, 2002; Traweger *et al.*, 2003).

Weitere, in verschiedene zelluläre Prozesse involvierte TJ-assoziierte Proteine sind z.B. Cingulin, Vinculin, Ahnak, die β - Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (Bal *et al.*, 2012), der Transkriptionsfaktor ZONAB (Balda *et al.*, 2003), die Na^+/K^+ -ATPase (Rajaskaran *et al.*, 2007), Caveolin (Nusrat *et al.*, 2000), der Internalisierungsmediator Clathrin (Ivanov *et al.*, 2004) und die *transforming growth factor* (TGF)- β -Rezeptoren I und II (Barrios-Rodiles *et al.*, 2005).

1.4 Fragestellungen

Die molekulare Basis der Redoxsensitivität von Occludin ist unklar. Es wird angenommen, dass Cysteine, die über die Occludinsequenz verteilt sind an der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung beteiligt sind. Da Cysteine redoxabhängig Disulfidbrücken ausbilden können, sollen Alanin-Austauschmutanten hochkonservierter Cysteine der TMD1 und 2 sowie der EZS2 von Occludin untersucht werden. Um herauszufinden, ob und wenn ja welche Cysteine die Redoxsensitivität begründen und welche Konsequenzen der Cysteinaustausch an den jeweiligen Stellen hat, wurden die entsprechenden Mutanten bezüglich ihrer zellulären Lokalisation, ihres Dimerisierungspotentials, ihrer funktionellen und morphologischen Konsequenzen für die TJs sowie ihrer Wechselwirkungen mit anderen TJ-Proteinen analysiert. Ein Beispiel für Redoxveränderungen sind reduzierende Bedingungen, die z.B. durch Hypoxie ausgelöst werden können. Aus diesem Grund werden die o.g. Untersuchungen neben Normoxie, unter Hypoxie und Applikation von Dithiothreitol (DTT) durchgeführt.

Es soll aufgeklärt werden, ob auf Basis redoxabhängig gebildeter Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen von Occludinmonomeren oder innerhalb des Moleküls (EZS2) Strukturveränderungen innerhalb der TJs entstehen, die oxidative Stressbedingungen in Veränderungen der TJ-Architektur und -Funktion umsetzen. Annahme ist, dass Cysteine an der Redoxregulation beteiligt sind.

1. Einleitung

Bezüglich der EZS2 ist ein Hauptziel die erstmalige Schaffung eines experimentell basierten Modells. Es soll weiterhin überprüft werden ob die interzelluläre Assoziation von Occludinmonomeren, ähnlich wie bei Claudin-5, auf der EZS2 basiert.

Oxidativer Stress kann zu Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von Occludin führen. Deshalb soll die Rolle der hypoxieaktivierbaren CK2-vermittelten Phosphorylierung Occludins näher beleuchtet werden. Es wird untersucht, ob sie sich auf die Homodimerisierung von Occludin und seine Interaktion mit ZO-1 auswirken kann.

Das Auftreten hochkonservierter Cysteine in den EZS2 aller TAMPs und den EZS1 aller Claudine sowie die Kenntnis von Interaktionen zwischen Occludin mit MarvelD3 und Claudin-1 sind Ausgangspunkt für die Untersuchung cysteinabhängiger Bindungen zwischen diesen Proteinen. Insbesondere wurde der Einfluss von Occludin auf die Claudin-1-basierte Barrierefunktion und Strangmorphologie untersucht, sowie Interaktionen zwischen Occludin und MarvelD3 analysiert. Folgende Hypothesen leiten sich ab:

1. Occludins extrazelluläre Cysteine assoziieren intramolekular und redoxabhängig.
2. Occludin dimerisiert redoxabhängig wobei Disulfidbrücken eine indirekte Rolle spielen.
3. Cysteine der TMD spielen eine Rolle bei der Oligomerisierung von Occludin, ohne dass Disulfidbrücken ausgebildet werden.
4. Die aus Dimerisierung und intramolekularer Assoziation resultierenden strukturellen Veränderungen wirken sich auf die TJ-Struktur und -funktion aus.
5. CK2-bedingte Phosphorylierung beeinflusst die Struktur und Funktion von Occludin.
6. Hochkonservierte Cysteine sind in die Assoziationen zu weiteren Proteinen der TJs, sowohl aus der TAMP- als auch aus der Claudinfamilie involviert.

Zur Untersuchung der Hypothesen werden Einzelaminosäureaustausche vorgenommen. Die daraus resultierenden Mutanten sollen in TJ-freie HEK-293-Zellen bzw. in endogen TJ-exprimierende MDCK-II-Zellen transfiziert werden. Die Analyse erfolgt durch Konfokalmikroskopie, Western Blots, Massenspektrometrie und TEER-Messungen an stabil transfizierten Zellen.

Um redoxempfindliche Aminosäurereste von Occludin zu identifizieren, wird der Einfluss der Mutationen auf *cis*- und *trans*-Interaktionen, sowie auf die Membranlokalisation unter Normoxie, Hypoxie und nach Inkubation mit DTT untersucht. Dabei sollen Dimerisierungsareale von Occludin identifiziert werden. Zur weiteren Charakterisierung der Interaktionen erfolgen Messungen der Membranmobilität der Occludinmutanten mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP). Konstrukttransfektion in MDCK-II-

1. Einleitung

Zellen soll zeigen, ob die Charakteristik der Mutanten z.B. durch Interaktionen mit anderen, endogen exprimierten, TJ-Proteinen verändert oder kompensiert werden kann.

Morphologische und funktionelle Einflüsse der Mutanten auf die TJs werden durch *freeze fracture*-Elektronenmikroskopie, TEER-Messungen und mittels Cellmask-Diffusionsassay untersucht. Der Nachweis disulfidbrückenbasierter heterologer Interaktionen erfolgt durch Kotransfektion der Occludinvarianten mit MarvelD3 und Claudin-1 in HEK-293-Zellen und wird durch die Untersuchung der Auswirkungen von Occludin auf die Claudin-1 basierte Strangbildung ergänzt.

Die Rolle der CK2-Phosphorylierung von Occludin für die TJ-Regulation soll mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Untersuchungen von phosphorylierungsimitierenden und phosphorylierungsblockierenden Mutanten untersucht werden. Die Mutationen sollen helfen, aufzuklären ob und wie die Homooligomerisierung Occludins sowie seine Interaktion zu ZO-1 durch die CK2 reguliert werden.

Die Kenntnis von miteinander interagierenden Oligomerisierungsdomänen von Occludin soll genauere Aussagen über die dreidimensionale Struktur des Moleküls bzw. von Molekülbereichen ermöglichen. Daraus sollen Rückschlüsse auf seine homologen und heterologen Interaktionen gezogen werden. Mit dem Vorschlag eines auf experimenteller Grundlage basierenden Modells soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der occludinvermittelten, redoxabhängigen TJ-Regulation geleistet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme, Medien und Antikörper

Die nachfolgenden Tabellen enthalten Auflistungen aller genutzten Geräte und Materialien (Tab. 2.1), Chemikalien, Enzyme und Medien (Tab. 2.2) sowie Antikörper (Tab. 2.3) in alphabetischer Reihenfolge:

Tab. 2.1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte

Geräte und Materialien	Modell	Hersteller
Agarosegelkammer	Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Cryo-Lager- und Transportsystem für Stickstofflagerung von Zelllinien	Chronos	Cryotherm, Euteneuen, Deutschland
Deckgläser	12 mm Durchmesser 30 mm Durchmesser	Cotech, Berlin, Deutschland
Durchflussscytometer	FACSVantage SE System	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektroporationsküvetten	1mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektroporator für Bakterien	EasyjecT Prima	EquiBio/Thermo Electron, Milford, USA
Falcon Tubes	50 ml (gelb)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Filterpapier für Western Blot	-	Bio-Step, Jahnsdorf, Deutschland
Fluoreszenzscanner	FLA-5000 Fluorstage and Multistage 4046. Filter LPB/Y510	FUJIFILM, Japan
Gefrierschrank (-80°C)	-86 ULT	Thermo Forma, USA
Heizplatte	Präzitherm PZ-28-1T	Störktronic, Deutschland
Hypoxiebank	Anaerobia Workstation Concept Plus	IUL Instruments/Russkin Technology Ltd., Bridgend, Großbritannien
Impedanzmessgerät	CellZScope	Nano Analytics, Münster, Deutschland
Inkubator für Bakterienkulturen	KS 15 A	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Inkubator für Zellkultur	CB210	Binder GmbH, Tuftlingen, Deutschland
Kryoröhrchen, 1,2 ml	-	Corning, Mexiko
Kühlbox zum Einfrieren von Zelllinien	-	Nalgene, USA
Küvetten für Spektralphotometer	-	BrandTech Scientific, USA
Laser Scanning Mikroskop	LSM 510 META-NLO	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Lumi-Imager	F1	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Massenspektrometer	Orbitrap hybrid mass spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Netzteile für Elektrophorese	Power Pac 3000 3000 Xi	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Objektträger	geschliffen, 90° Mattrand, 76 x 26 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm	Parafilm® M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Gerät	DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Petrischalen (verschiedene Größen)	-	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Phase Contrast IMT-2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	MC 1 RC 2 10 D	Sartorius, Deutschland
pH-Meter	IKA-Tron ETS-D2	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Sauerstoffsensoren	CellOx 325	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Schüttelplatte	Polymax 2040	Heidolf, Deutschland
SDS- Gelelektrophoresekammer	Mini-protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2. Material und Methoden

Serologische Pipetten	(2, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
SpeedVac	DNA 110	Savant, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Spektralphotometer	DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, USA
Sterilwerkbank	BDK-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifugen	5415 C 5417 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transfermembran (Nitrozellulose)	Hybond™ -ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transilluminator	Lumi-Imager F1™	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Ultraschallgerät	Vibracell 72434	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich
Vakuumpumpe	Vacumat 130-K	Helmut Saur Laborbedarf, Deutschland
Volt-Ohm-Meter	Millicell®-ERS	Millipore, Eschborn, Deutschland
Vorratsbehälter für Flüssigstickstoff	Apollo	Cryotherm, Euteneuen, Deutschland
Vortex	VF 2	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasserbad	Schüttelwasserbad 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland
Westernblot- Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturfilter	PIHA 01250	Merck Millipore, Billerica, USA
Zellkulturflasche	25 und 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte	6 und 24 wells	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber	-	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Zellseparationssieb	Porengröße 35 µm	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Zentrifugen	5804 R 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tab. 2.2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Medien

Agenz	Hersteller
AccuPol DNA Polymerase + Buffer	VWR, Radnor, USA
Aceton	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril (<i>ultra gradient HPLC grade</i>)	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
Acrylamid/BisSolution 30%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Advantage-2-Polymerase	Clontech. Biosciences, Heidelberg, Deutschland
10 x Advantage 2 PCR buffer	
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Hercules, CA, USA
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Benzonase	Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland
Brefeldin A	Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland
Cellmask	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie G250	Fluka, Steinheim, Deutschland
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DNA Ligase (T4 DNA Ligase)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
DNA-Marker (100bp-GeneRuler™; 1kb DNA-Marker GeneRuler™; dNTPs)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
dNTP Mix (100 mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einfriermedium	90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO
Ethanol (99,9%)	Berkel AHK, Berlin, Deutschland

2. Material und Methoden

Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
fluoreszierender Proteinstandard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gelextraktionskit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Geneticin (G418)	Calbiochem/EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA
GLUTA-MAX DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium + GLUTA MAX I; +3,7 g/L NaHCO ₃ +1,0 g/L D-Glucose – L-Glutamin)	Invitrogen. GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd Grade I 25%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HBSS (<i>Hanks blank salt solution</i>) mit und ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethane sulfonic acid (HEPES)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Iodacetamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Isopropanol	VWR International, Briare, Frankreich
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-alanyl-L-glutamin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lumineszenzsubstanz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Luria Broth (LB)-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Optimem TM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
PBS (Dulbecco phosphate buffered saline (mit und ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺))	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin (10000 U/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Plasmid mini-prep kit Zypyi	Zymo Research, Irvin, CA, USA
PLL (Poly-L-Lysine hydrobromide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitor-complete tablets mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteinmarker (SeeBlue Plus 2 Prestained Marker)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsendonucleasen (<i>SacI</i> , <i>KpnI</i>)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
SDS (sodium dodecylsulfate)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SYBR Safe DNA Gel stain 10000 x in DMSO	Invitrogen. Molecular Probes, Eugene, OR, USA
TEMED (N'N'N'N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TRIS-Base (>99%), TRIS-HCl (>99%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau (0,05% in PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin 0,05%-EDTA 0,025%	Invitrogen. GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tab. 2.3: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Anmerkung
Maus-anti-Aktin	Calbiochem	Primärantikörper (monoklonal)
Kaninchen-anti-FLAG	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	Primärantikörper (Polyklonal)
Ziege-anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Sekundärantikörper, gekoppelt mit Alexa Fluor 555
Ziege-anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Sekundärantikörper, gekoppelt mit Alexa Fluor 647
Kaninchen-anti-Occludin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Primärantikörper (polyklonal)
Maus-anti-ZO-1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Primärantikörper (polyklonal)

2.1.2 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Die Vervielfältigung der Produkte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kap. 2.2.1) und der Mutagenese (Kap. 2.2.2) erfolgte durch Transformation der DNA (Kap. 2.2.3) in *Escherichia*

(*E. coli*)-Bakterien des Stammes DH5 α . Dieser von D. Hanahan entwickelte Sicherheitsstamm zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus.

Zur Charakterisierung von Proteininteraktionen wurde die c-DNA der zu untersuchenden Proteine in die eukaryotischen Zelllinien *human embryonic kidney* (HEK)-293 und *Madin Darby canine kidney* (MDCK)-II transfiziert. Die erste Beschreibung von HEK-Zellen erfolgte 1977 durch Graham und Mitarbeiter an der Universität Leiden (Niederlande). Der Namenszusatz 293 zeigt die Nummer des Experimentes an, bei welchem die Zelllinie erfolgreich geschaffen wurde. HEK-293-Zellen sind immortalisierte, humane embryonale Nierenzellen aus gesunden zwei bis drei Monate alten Föten. Es handelt sich um *hypotriploide* Epithelzellen, die adhärent wachsen, sich vergleichsweise gut transfizieren und kultivieren lassen sowie keine TJs exprimieren. Sie beinhalten keine Claudine und Occludin, weshalb dieser Zelltyp keine Widerstände über Zellrasen ausbildet.

MDCK-II-Zellen sind Nierenzellen des distalen Tubulus sowie des Sammelrohres des Nephrons des Hundes (*Canis familiaris*). Sie entspringen der heterogenen Ursprungszelllinie, die 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby aus einem weiblichen Cockerspaniel isoliert wurde. Der Klon MDCK-II ist der dominierende bei höheren Passagen dieser Ursprungszelllinie. MDCK-II-Zellen exprimieren endogene TJs und sind daher für TEER- und Permeabilitätsmessungen gut geeignet. Dieser Zelltyp baut dichte Zellrasen auf, die Widerstände von 100-180 Ohm erreichen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung von humanem Occludin in cyan- und yellow fluorescence protein- (CFP und YFP) Expressionsvektoren

Occludin^{Wildtyp (wt)} wurde von Dr. David Antonetti (Universität Michigan) im puB-Vektor zur Verfügung gestellt. Mittels PCR und Klonierungsprimern wurde Occludin amplifiziert (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: PCR-Programm für die Klonierung von humanem Occludin in die Expressionsvektoren pEYFP-C1 und pECFP-C1.

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Inkubationszeit
Denaturierung	1	95 °C	1' 30''
Denaturierung		95 °C	30''
Primeranlagerung	30	66 °C	1'
Elongation		68 °C	2'
Elongation	1	70 °C	10'
Kühlung	1	4 °C	∞

Zur Erzeugung der für die Klonierung erforderlichen Schnittstellen (*SacI* und *KpnI*), wurden die folgenden Primer verwendet:

SacI sense: 5'-GATCTCGAGCTCAGATGTCATCCAGGCCTCTTG-3'

KpnI antisense: 5'-GAGCACGGTACCCTATGTTTTCTGTCTATCATAG-3'

Auf die Amplifikation erfolgte der Restriktionsverdau von Vektor und Zielgen über Nacht (ü.N.) bei 37°C durch die Enzyme *SacI* und *KpnI* (Fermentas). Diese Erkennungssequenzen finden sich innerhalb der *multiple cloning site* (MCS) des Zielvektors wieder. Beendet wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 80°C für 20 min. Anschließend wurden beide Ansätze in einem 1%igen Agarosegel bei 80 V für ca. 45 min aufgetrennt und die Banden des linearisierten Vektors sowie des *inserts* ausgeschnitten. Es folgte die Aufreinigung der DNA mittels *Elution from Gel-Kit* (Qiagen).

Ligiert wurde durch Vereinigung von Vektor und *insert* sowie die Zugabe von 2,5 µl Ligasepuffer mit ATP und 2 µl T4-DNA-Ligase (Fermentas). Die Ligation inkubierte ü.N. in der PCR-Maschine (BioRad) bei 16°C. Inaktiviert wurde die Ligase bei 65 °C für 10 min.

2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Induktion der Mutationen in das Occludin erfolgte durch ortsgerechte Mutagenese, die modifiziert nach dem *quickchange mutagenesis*-Protokoll (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt wurde. Diese Methode ist PCR-basiert. Es wurden zwei Ansätze pipettiert, die sich in ihrer Zusammensetzung nur bezüglich des Primers unterschieden: Ein Ansatz enthielt nur den *sense*-, der andere Ansatz nur den *antisense*-Primer. Mit Hilfe der komplementären Mutageneseprimer wurden die Mutationen mit zwei aufeinanderfolgenden PCR-Programmen induziert (Tab. 2.5):

Tab. 2.5: Darstellung der PCR-Abläufe bei der ortsgerechten Mutagenese von humanem Occludin

PCR-Schritt	PCR 1	PCR
1	95°C for 2'	95°C for 30''
2	95°C for 30''	95°C for 30''
3	65°C for 45''	68°C for 1'
4	72°C for 12'	72°C for 12'
5	Goto 2 4x	Goto 2 16x
6	4°C ∞	72°C for 20'
7		4°C ∞

Nach Ablauf der ersten PCR wurden beide Ansätze vereinigt und weitere 0,5 µl DNA-Polymerase (Clontech) dazugegeben. Nach Ablauf von PCR2, die sich hinsichtlich der Anlagerungstemperatur der Primer und der Zyklusanzahl vom ersten PCR-Schritt unterschied (Tab. 2.5), wurden die Reaktionsansätze mit 20 U *DpnI* (Fermentas) versetzt und 5 h bei 37 °C inkubiert. *DpnI* katalysiert die Hydrolyse der bakteriellen, methylierten DNA, während die

2. Material und Methoden

PCR-synthetisierte DNA nicht verdaut wird (Vovis & Lacks, 1977). Anschließend wurden 1-2 µl des Ansatzes in elektrokompente *E. coli*-Bakterien (DH5α) transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen (Kap. 2.2.3). Tabelle 2.6 fasst die erzeugten Mutantenkonstrukte und die entsprechenden Mutageneseprimer zusammen. Alle Primer sind in 5' → 3'-Orientierung angegeben.

Tab. 2.6: Verwendete Mutageneseprimer für die Induktion verschiedener Substitutionsmutanten in humanes Occludin (Occ)

Konstrukte	Primersequenz; mutierte Triplets sind fett hervorgehoben
humanes- YFP-Occludin ^{C76A} CFP-Occ ^{C76A} FLAG-Occ ^{C76A}	<i>sense</i> : CTATGCTCATTATTGTGATG GCC ATTGCCATCTTTGCCTG <i>antisense</i> : CACAGGCAAAGATGGCAAT GGC CATCACAATAATGAGCAT
humanes- YFP-Occ ^{C82A} CFP-Occ ^{C82A} FLAG-Occ ^{C82A}	<i>sense</i> : CATTGCCATCTTTGCC GCC GTGGCCTCCACGCTTG <i>antisense</i> : CAAGCGTGGAGGCCAC GGC GGCAAAGATGGCAATG
humanes- YFP-Occ ^{C82S} CFP-Occ ^{C82S}	<i>sense</i> : ATTGCCATCTTTGCC TC AGTGGCCTCCACGCTTGC <i>antisense</i> : GCAAGCGTGGAGGCCAC TGA GGCAAAGATGGCAAT
humanes- YFP-Occ ^{C148A} FLAG-Occ ^{C148A}	<i>sense</i> : CCATGGCTGCCTTT GCC TTTATTGCCGCGTTG <i>antisense</i> : CAACGCGCAATGAA GGC AAAGGCAGCCATGG
humanes- YFP-Occ ^{C216A} FLAG-Occ ^{C216A}	<i>sense</i> : CACAAATATATGCCCTC GCC AACCAATTTTATACACC <i>antisense</i> : GGTGTATAAAATTGGTT GGC GAGGGCATATATTTGTG
humanes- YFP-Occ ^{C237A} FLAG-Occ ^{C237A}	<i>sense</i> : CAGTATTTGTATCACTAC GCC GTTGTGGATCCCCAGGAGG <i>antisense</i> : CCTCCTGGGGATCCACAAC GGC GTAGTGATACAAATACTG
humanes- YFP-Occ ^{C237S}	<i>sense</i> : GTATTTGTATCACTAC TCT GTTGTGGATCCCCAGG <i>antisense</i> : CCTGGGGATCCACAAC AGA GTAGTGATACAAATAC
humanes- YFP-Occ ^{Y220A} FLAG-Occ ^{Y220A}	<i>sense</i> : ATGCCCTCTGCAACCAATTT GCT TACACCTGCAGCTACTGG <i>antisense</i> : CCAGTAGCTGCAGGTGT AGC AAATTTGGTTGCAGAGGGCAT

Die YFP-Occludinmutanten T400A/T404A/S408A, T400E/T404E/S408E und S408E wurden von Dr. Max Dörfel generiert und uns von Prof. Dr. Ottmar Huber (Institut für Biochemie II, Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Transformation

Die durch Klonierung und Mutagenese erzeugten Konstrukte wurden zur Lagerung und Vervielfältigung durch Elektrotransformation in *E. coli*-DH5 α eingebracht. Dazu wurden 1,5 μ l des Ligations- oder Mutageneseansatzes mit 50 μ l elektrokompenten Bakterien vermischt und in einer Elektroporationsküvette in das Elektroporationsgerät (EasyjecT prima, EquiBio) eingesetzt. Es erfolgte ein elektrischer Impuls von 1800 V, der kurzzeitige Porenbildung in der Bakterienmembran bewirkte. Durch diese Poren diffundierten die Plasmide in die Bakterien. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml erwärmtes LB-Medium (Roth) aufgenommen und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Inkubation wurde 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 150 μ l LB-Medium erfolgte der Ausstrich auf Agarplatten, die mit Antibiotika (Roth), entsprechend des Resistenzgens des transformierten Vektors versetzt waren (Kanamycin bei pEYFP-C1 und pECFP-C1, Ampicillin bei p3xFLAG). Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien selektiert. Dazu wurden Abstriche einzelner Kolonien in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt und ü.N. bei 37°C und 280 rpm im Brutschrank (Bühler GmbH) geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden zur Anlage von Glycerolstocks 800 μ l dieser Bakteriensuspension mit 200 μ l 80%-igem Glycerol (Serva) versetzt und bei -80°C eingefroren. Die restliche Suspension wurde für die DNA-Präparation nach Herstellerangaben (*Plasmid Miniprep kit Zyppi; Zymo Research*) 10 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch den Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Gütekontrolle der generierten Konstrukte erfolgte durch DNA-Sequenzierung. Die DNA wurde entweder in Kooperation mit den Firmen Invitek und ImaGenes (beide ansässig auf dem Campus Berlin-Buch) oder durch die hausinterne Sequenzierereinrichtung (FMP Berlin) unter Herrn Dr. Klausenz sequenziert. In Vorbereitung für die interne Sequenzierung erfolgte die Amplifikation der DNA mit den entsprechenden Sequenzierungsprimern sowie die DNA-Fällung. Tabelle 2.7 zeigt eine Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer (synthetisiert durch die Firma BioTez Berlin-Buch GmbH):

2. Material und Methoden

Tab. 2.7: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer.

Primername	Bindung	Sequenz
YFP- <i>sense</i>	YFP-Vektor, innerhalb der YFP-Sequenz	ACATGGTCCTGCTGGAGTTC
YFP- <i>antisense</i>	YFP-Vektor, gegenüber der YFP-Sequenz außerhalb der MCS	CCTCTACAAATGTGGTATGGC
Occseqmid- <i>sense</i>	innerhalb Occludins (Pos. 843-872)	GGACAAGGAACACATTTATGATGAGCAGCC
Occseqmid- <i>antisense</i>	innerhalb Occludins (Pos. 872-843)	GGCTGCTCATCATAAATGTGTTCCCTTGTC
Occseqfull- <i>sense</i>	innerhalb Occludins (Pos. 1-33)	ATGTCATCCAGGCCTCTTGAAAGTCCACCTCCT
Occseqfull- <i>antisense</i>	innerhalb Occludins (Pos. 1569-1538)	CTATGTTTTCTGTCTATCATAGTCTCCAACC
Occseq216/ 237- <i>sense</i>	innerhalb Occludins (Pos. 451-474)	GCCGCGTTGGTGATCTTTGTTACC

Alle Primer sind in 5'→3' Orientierung angegeben. Occ, Occludin; seq, Sequenzierung; mid, *middle* (dt. Mitte) des Occ-Gens; Pos, Position.

Ausgewertet wurden die Sequenziererergebnisse mit *FinchTV* (Geospiza Inc.). Dieses Programm ermöglicht den direkten Sequenzabgleich mit der *Blast*-Funktion des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&QUERY>).

2.3 Zellkultur und proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

HEK-293-Zellen wurden bei 37 °C in c-DMEM (*completed-Dulbeccos modified eagle medium*, DMEM; Invitrogen) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS, Invitrogen), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) und 1% l-Analyt-l-Glutamin bei 5% CO₂ unter Feuchtigkeitssättigung kultiviert. Zum Kulturerhalt wurde die Zellzahl im Abstand von drei (1:8) bzw. zwei Tagen (1:6) reduziert. Nach Absaugen des Mediums und waschen mit PBS (*phosphate buffered saline solution*; Biochrom) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ folgten die Zugabe von 0,05% Trypsin/EDTA (Invitrogen) sowie die Inkubation auf der Wärmeplatte (Störktronic). Nachdem sich die Zellen deutlich sichtbar abgelöst hatten, wurden sie in c-DMEM resuspendiert und ein entsprechender Teil der Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt. Die Kultivierung der MDCK-II-Zellen erfolgte analog zu den HEK-293-Zellen, aber unter 10% CO₂. Da dieser Zelltyp schneller wächst, wurde alle drei bzw. zwei Tage 1:12 bzw. 1:8 reduziert. MDCK-II-Zellen wurden aufgrund ihrer stärkeren Anheftung zweimal mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und die Ablösung erfolgte mit 0,25% Trypsin/EDTA.

Zur Untersuchung von Occludin unter Hypoxie erfolgte die Inkubation der Zellen für 3,5 h in einer Hypoxiekammer (IUL Instruments/Ruskin Technology Ltd.) unter einer

sauerstoffarmen Atmosphäre (0,6%) bei 37 °C. Hypoxie tritt u.a. bei Thrombosen wie z.B. beim Schlagfall, bei Asthma und bei verschiedenen Tumoren auf. Zur chemischen Induktion reduzierender Bedingungen wurden die Zellen mit 5 mM DTT (Roth) inkubiert.

2.3.2 Transiente und stabile Transfektion eukaryotischer Zelllinien

Die transiente Transfektion der Zelllinien erfolgte durch Lipofektion mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Dazu wurden Zellen zu etwa 90% Konfluenz im 6-well-Format (jeweils 10 cm² Fläche; Biochrom) ausplattiert. Für jede Transfektion wurden insgesamt 4 µg DNA benötigt. Bei Kotransfektionen wurden daher von jedem Konstrukt nur 2 µg transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und auf zwei 30 mm Deckgläschen (Cotech) verteilt, die für bessere Anheftung für 1 h mit Poly-L-Lysin (PLL, 25 µg/ml Endkonzentration; Sigma) beschichtet worden waren. Nach einer weiteren ü.N.-Inkubation konnten die Zellen für die mikroskopische Analyse am *laser-scanning*-Mikroskop (LSM; Carl Zeiss) genutzt werden.

Nachfolgend werden drei in dieser Arbeit durchgeführte Methoden erläutert, um eine stabile Expression des Genproduktes eines transfizierten Gens zu induzieren. Der Klonpool: Zur Erzeugung stabiler Linien mit YFP-Occludin wurde 24 h nach Transfektion der Inhalt jeweils eines *wells* in eine T 75 Zellkulturflasche (75 cm² Grundfläche; Greiner) mit c-DMEM überführt, dem das Selektionsantibiotikum Geneticin (G418, Calbiochem) 1:100 zugesetzt wurde. G418 hemmt die Polypeptidsynthese durch Inhibition der Elongation und wird durch das Genprodukt des *Neo^R*-Gens, welches der transfizierte Vektor beinhaltet, inaktiviert. Ist die Zelle nicht transfiziert, führt G418 somit zum Zelltod. Da es sich bei der Zelllinie nach der Selektion um einen Mischklon handelt, sind klonale Variationen eliminiert.

Anreicherung transfizierter Zellen durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung: Zellen, die fluoreszierende Proteine (z.B. CFP-, YFP-, GFP-Fusionsproteine) exprimieren, wurden trypsiniert (Kap. 2.3.1) und in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit 5 mM EDTA resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 230 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dies wurde zum Auswaschen des restlichen Ca²⁺ und Mg²⁺ zweimal wiederholt um die Vereinzelung der Zellen in Vorbereitung des Sortierungsprozesses zu erleichtern. Das Vereinzeln erfolgte durch Filtration durch ein Zellseparationssieb mit einer Porengröße von 35 µm (BD Biosciences). Das Sortierungsprinzip basiert auf der Bildung eines Zellstrahls, der den Durchmesser einer Zelle hat. Die Zellen werden an einem Lasermodul vorbeigeleitet, welches die Zellen z.B. mit der Anregungswellenlänge von YFP (514 nm) bestrahlt und die

Emmission des Moleküls detektiert. Fluoreszierende Zellen werden ionisiert und durch ein elektrisches Feld abgelenkt. So erfolgte die Separation von positiven und negativen Zelle in verschiedene Sammelgefäße schnell und effizient. Bei dieser Methode ist der Einfluss klonaler Variationen vernachlässigbar, weil es sich um eine Mischklonkultur handelt.

Die Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe des FACSVantage SE System (BD Biosciences) in der Arbeitsgruppe von Dr. Hans-Peter Rahn am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch durchgeführt.

Einzelklonisolation: Bei FLAG-Occludin transfizierten Zellen, mussten Einzelklone selektioniert und kultiviert werden. Die Selektion erfolgte durch Verdünnung der G418 behandelten, transfizierten Zellen (1:80, ausgehend vom konfluenten Zellrasen). Nach der Absterbephase wurden die anwachsenden Klone durch mit Silikon bestrichene Glaszylinder separiert. Silikon sicherte die Abdichtung des Zylinderinnenraumes gegen den Außenraum und ermöglichte so das Trypsinieren der Klone ohne Austausch mit außen liegenden Zellen. Die Einzelklone wurden in 6-well-Zellkulturgefäßen angezogen. Aufschluss über die FLAG-Occludinexpression der einzelnen Klone gaben die Fixierung und die anschließende Immunofluoreszenzfärbung (Kap. 2.3.4).

2.3.3 Anlage und Reaktivierung von Kryokulturen eukaryotischer Zelllinien

Um Zellen aus der Kultur zu nehmen, sie jedoch zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt wieder reaktivieren zu können, wurden wichtige Zelllinien in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen proteolytisch abgelöst (Kap. 2.3.1) und in DMEM ohne FKS und Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 220 g für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Einfriermedium (90% FKS + 10% DMSO) pro einzufrierendem Kryoröhrchen (Corning) resuspendiert. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Einlagerung der Gefrierkulturen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

Die Wiederaufnahme der Zelllinien in den Kultivierungsprozess erfolgte durch schnelles Auftauen der Proben im Wärmebad (GFL) bei 37 °C, um eine Schädigung der Zellen durch DMSO (Sigma) zu minimieren. Die Zellen wurden in vorgewärmtes c-DMEM überführt und im Inkubator inkubiert.

2.3.4 Zellfixierung und immunocytochemische Färbung

MDCK-II-Zellen wurden auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm (Cotech) ausgesät und bis zur Konfluenz über mindestens 48 h kultiviert. Die Fixierung erfolgte durch Eintauchen der bewachsenen Deckgläschen in 100% Aceton (Roth) für 5 min (Wasserentzug), gefolgt von jeweils einer min in 100% unvergälltem Ethanol (Berkel) sowie einer weiteren min in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Deckgläschen wurden mit 1% BSA, 0,05% Tween 20, 0,02% NaAzid in PBS für 10 min blockiert, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Die Primärantikörperinkubation erfolgte mit einer Verdünnung von 1:200 in 60 μl Blockierpuffer für 1 h, die des Sekundärantikörpers mit einer Verdünnung von 1:250 in 60 μl Blockierpuffer für 30 min. Zwischen der Inkubation mit den Antikörperlösungen wurden die Deckgläschen fünfmal zwei min mit Blockierpuffer gewaschen. Alle Deckgläschen wurden auf Objektträgern (Roth) fixiert und für 2 h bei 37 °C oder alternativ ü.N. bei 4 °C getrocknet.

Analysiert wurden die Proben mit einem LSM510-META-NLO- Konfokalmikroskop unter einem PlanNeofluar 100x/1.3-Öl-Objektiv (Carl Zeiss Jena GmbH) (Kap. 2.3.5). Dieses Mikroskop ist mit einem HeNe-, einem Argon- und einem Chameleon-Saffir-Multiphotonenlaser sowie einem Spektraldetektor ausgerüstet. Die Fluoreszenz der Ziege- α -Kaninchen-AlexaFluor488-gefärbten Präparate wurde bei einer Wellenlänge (λ_{exc}) von 488 nm (Argon-Laser) angeregt und die Emissionswellenlänge (λ_{em}) zwischen 500 und 530 nm detektiert. Die der Ziege- α -Kaninchen-AlexaFluor405-gefärbten Präparate wurde bei 810 nm angeregt (Chamaeleon Saffir; zwei-Photonen-Technologie) und bei 410-450 nm detektiert. Die der Ziege- α -Maus-AlexaFluor647-gefärbten Präparate bei 633 nm angeregt (HeNeII-Laser) und bei 650-710 nm detektiert. Die Dicke der optischen Schichten betrug 0,9 μm . Das Scannen erfolgte unidirektional mit einer Geschwindigkeit von ca. 7 μs pro Pixel. Die Detektion wurde aus 4-8 sequentiellen Scans gemittelt, um unspezifische Hintergrundsignale zu minimieren.

2.3.5 Analyse lebender Zellen mit dem *laser scanning*-Mikroskop

Die transfizierten Zellen wurden mitsamt den Glasdeckgläschen (30 mm Durchmesser) aus den Vertiefungen der 6-well-Platte in eine Zellbeobachtungsküvette überführt. Die Küvette mit den Zellen wurde anschließend mit 1 ml HBSS (*Hanks Blank salt solution*, Invitrogen) mit Ca^{2+} und Mg^{2+} befüllt und mit dem LSM510-META-NLO analysiert (Kap. 2.3.4). Die

Anregung von CFP erfolgte mit dem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 458 nm (50% Leistung, 8-15% Transmission), die von YFP bei 514 nm (50% Leistung, 1-7% Transmission, Argon-Laser). Die Detektion von CFP erfolgte im Wellenlängenbereich von 463-495 nm, die von YFP bei 527-634 nm (585 nm in Verbindung mit Trypanblau). Trypanblau (Sigma) wurde bei 543 nm mit dem HeNe-Laser angeregt. Der Detektionsbereich dieser plasmamembrananfärbenden Lösung liegt bei >590 nm. Cellmask (Invitrogen), ein weiterer Membranfarbstoff, wurde ebenfalls mit dem HeNe-Laser bei 633 nm angeregt und zwischen 650 und 710 nm detektiert.

2.3.6 Zellyse, SDS-PAGE und Western Blot

Für die Analyse des Oligomerisierungsgrades und der Expression der Zielproteine wurden Zellysate stabil transfizierter HEK-293-Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen im *6-well* Format für mindestens 48 h kultiviert und anschließend bei Bedarf für 3,5 h in der Hypoxiekammer bei 0,6% O₂ inkubiert. Die Lyse der schockgefrorenen Zellen erfolgte in 80 µl/*well* eines Zellysepuffers (20mM Tris pH 7.4; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,008% Benzonase; 1,5% Triton-X-100 sowie Proteaseinhibitor-Mix in einer Verdünnung von 1:10). Die Proben wurden in Kryoröhrchen unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung erfolgte für maximal drei Monate bei -80°C.

Zur Auftrennung der Proteine des Zellysates wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) verwendet. Es kamen Gele mit Acrylamidkonzentrationen von 5% bzw. 4% im Sammelgel sowie 8% bzw. 6% im Trenngel zum Einsatz. Die Proben wurden schnellstmöglich aufgetaut, durch eine 25 Gauge Kanüle homogenisiert und für 12 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ladepuffer (1% Triton X-100, 25 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 4 mM EDTA sowie Protease Inhibitor 1:500 in Wasser) im Verhältnis 1:2 gemischt und bei Bedarf mit DTT versetzt (finale Konzentration 150 mM) oder für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V für 1,5 h im Kühlraum. Nachfolgend wurden das Gel und eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulosemembran (Amersham Biosciences) für 10 min in Transferpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol) equilibriert und Whatman-Filterpapiere (Biostep) ebenfalls darin getränkt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte innerhalb der ersten 15 min bei 15 V, dann für 45 min bei 20 V (Semidry Transferkammer, BioRad).

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h in 5% Milchpulver (BioRad) in TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris Base, 0,05% Tween 20, pH 7.4) geblockt, um die Bindung der

Antikörper an die Membran zu minimieren. Nach Waschen der Membran in TBST folgte die ü.N.-Inkubation mit der Primärantikörperlösung (1:1000 in TBST) im Kühlraum. Am nächsten Morgen wurde ungebundener Primärantikörper fünfmal für je 5 min mit TBST ausgewaschen und die Membran für 1,5 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert (1:1500 in TBST). Nach erneutem Waschen wurde der Blot mit Lumineszenzlösung (Roche) entwickelt. Die Chemilumineszenz wurde mit dem LumiImager (Boehringer-Mannheim) bei 428 nm detektiert. Dies ermöglichte die Identifikation von Occludin sowie die Bestimmung seines Molekulargewichtes und damit das Bestimmen des Oligomerisierungsgrades.

Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte durch ImageJ. Es wurde das Verhältnis der Intensitäten von Monomer- und Dimerbanden ermittelt und auf die Kontrolle (wt unter Normoxie) bezogen. Dies ermöglichte eine quantitative Auswertung durch den Vergleich des Dimer- zu Monomeranteils zwischen verschiedenen Occludinmutanten bzw. im Vergleich zum wt sowie zwischen Normoxie und Hypoxie und mit oder ohne Zugabe des disulfidbrückenbrechenden Reduktionsmittels DTT.

2.3.7 Massenspektrometrie

Um zu bestätigen, dass es sich bei den Banden aus den Western Blots um das transfizierte Konstrukt und seine Oligomere handelt, wurden die SDS-Gelbereiche in denen die YFP-Occludin-Monomer- und -Dimerbanden detektierbar waren ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden mit 50% Acetonitril (J.T. Baker) in 25 mM Ammoniumbicarbonat (*sequencing grade modified*, Promega) gewaschen, durch Dehydration in Acetonitril geschrumpft und in der *Speed Vac*-Vakuumentrifuge (Thermo Scientific) getrocknet. Disulfidbrücken wurden durch 70 µl 10 mM DTT in 25 mM Ammoniumbicarbonat für 45 min bei 55 °C reduziert. Die Alkylierung erfolgte durch Austausch der DTT-Lösung mit 70 µl 55 mM Iodacetamid (Serva) in 25 mM Ammoniumbicarbonat. Die Gelstücke wurden anschließend durch 10 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat mit 50 ng Trypsin für 12 h verdaut. Durch den tryptischen Verdau entstanden Peptide, die mittels LC-MS/MS-Analyse an einem *LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer* (Thermo Fisher), ausgerüstet mit einem Eksigent 2D nanoflow LC system (Axel Semrau GmbH), analysiert wurden (Lange *et al.*, 2010). Die Masse der gefundenen Peptide wurde mit den Ergebnissen eines theoretischen tryptischen Verdau des Zielkonstruktes verglichen. Für einen sicheren Nachweis des Proteins müssen mindestens zwei Peptide identifizierbar sein.

2.3.8 Membranlokalisationsstudien

Die subzelluläre Verteilung transfizierter, fluoreszenzmarkierter YFP-Occludinkonstrukte wurde durch Membranlokalisationsstudien untersucht. Dazu wurde das Occludin-Fluoreszenzsignal in einen membranständigen und einen cytosolischen Pool unterteilt. Um dies zu ermöglichen, wurde ein Algorithmus für das Programm ImageJ generiert, welches die Subtraktion verschiedener Fluoreszenzkanäle in einem LSM-Bild ermöglicht. Es wurden Bilder verwendet, in denen die Plasmamembranen durch Trypanblau angefärbt wurden (80 $\mu\text{l/ml}$ in HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}). Vom Bild des YFP-Signals (Occludin) wurde das Bild des Trypanblau-Signals (Plasmamembran) abgezogen. Das resultierende Bild zeigte das gesamte YFP-Occludinsignal, welches nicht mit der Membran assoziiert ist (den sogenannten intrazellulären Pool). Wird das Signal dieses Bildes nun vom Ursprungsbild, welches das gesamte YFP-Occludinsignal zeigt, abgezogen, entsteht ein Bild des gesamten membranassoziierten YFP-Occludinsignals (membranlokalisierter Pool). Die Flächen, die beide Pools jeweils einnahmen, wurden mit ImageJ ausgemessen und miteinander ins Verhältnis gesetzt ($\text{Membran/Cytosol-Rate} = \text{membranlokalisierter Pool} / \text{intrazellulärer Pool}$). Je höher dieses Verhältnis ist, desto stärker ist das untersuchte Konstrukt in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert.

2.3.9 Messung der *trans*-Interaktionen (Anreicherungsstudien in Zell-Zellkontakten)

Interaktionen zwischen Proteinen in den Plasmamembranen benachbarter Zellen werden als *trans*-Interaktionen bezeichnet. Es wurde vorausgesetzt, dass Signalanreicherung am Zell-Zellkontakt auf direkter *trans*-Interaktion basiert. Die Quantifizierung dieser Interaktionen erfolgte durch Messung von Anreicherungsprofilen mittels der Zeiss-Software *AimImageBrowser*. Es wurde ein vektorieller Pfad durch zwei benachbarte, YFP-exprimierende Zellen gelegt, die entweder mit untransfizierten Zellen benachbart waren oder keine direkten Nachbarzellen hatten (Abb. 2.1).

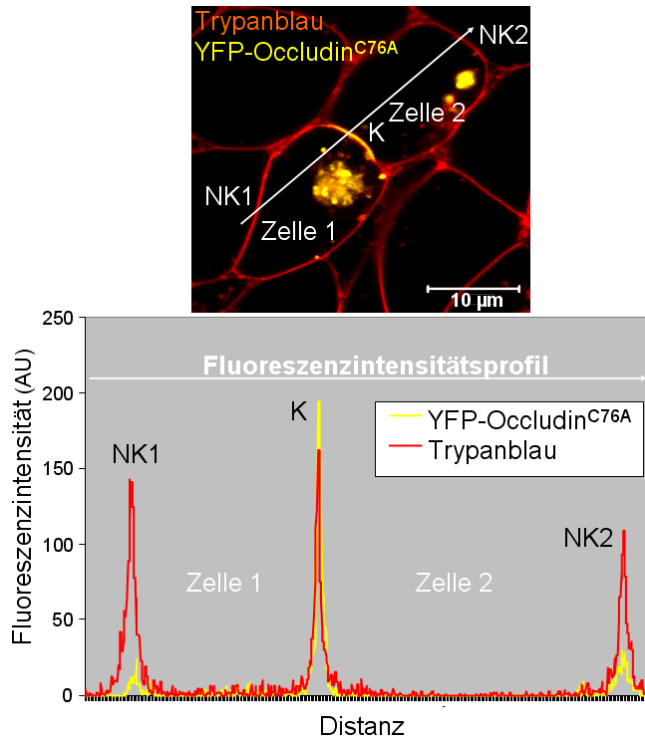


Abb. 2.1: Quantifizierung der Kontaktanreicherung als Ausdruck der *trans*-Interaktionen mittels Fluoreszenzintensitätsprofilen. Das Fluoreszenzintensitätsprofil entlang eines vektoriellen Pfades (weißer Pfeil) ermöglicht die Berechnung des Kontaktanreicherungsfaktors. Plasmamembranen wurden durch Trypanblau (rot) angefärbt. Gelber Graph, Signalprofil von YFP; roter Graph, Signalprofil von Trypanblau; K, Zell-Zellkontakt zwischen zwei occludinexprimierenden Zellen; NK, Nichtkontakt oder Kontakt zwischen einer transfizierten und einer untransfizierten Zelle; F_K , Fluoreszenz am Zell-Zellkontakt zwischen zwei transfizierten Zellen; F_{NK} , Fluoreszenz in der Nichtkontaktmembran oder in Nachbarschaft einer transfizierten zu einer untransfizierten Zelle; AU, *arbitrary unit*.

Die Software misst für jeden Pixel entlang des Vektorpfades die Fluoreszenz. Eine Anreicherung lag vor, wenn das Zell-Zellkontaktsignal stärker als die Summe der Signalintensitäten der Nichtkontaktbereiche oder die Summe der Signalstärken in Nachbarschaft zu untransfizierten Zellen war. Die Stärke der Anreicherung am Zell-Zellkontakt wurde durch: $A = S_K / (SZ1_{NK} + SZ2_{NK})$ berechnet, wobei: A, Anreicherung am Zell-Zellkontakt; S, Signalintensität; K, Kontaktbereich; NK, Nichtkontakt; Z, Zelle. Als Negativkontrolle dienten *corticotropin-releasing-factor-receptor* (CRFR)-1-transfizierte Zellen.

2.3.10 Messung der *cis*-Interaktionen (*fluorescence resonance energy transfer*)

Interaktionen von Proteinen innerhalb einer Plasmamembran werden als *cis*-Interaktionen bezeichnet. Diese Interaktionen können durch FRET quantifiziert werden. Voraussetzung ist die Kofunktion der auf Interaktion zu testenden Proteine und deren Fusion mit Fluoreszenztags deren Anregungsenergien kompatibel sind. Um als FRET-Paar geeignet zu sein, muss die Anregungswellenlänge des Donors geringer sein als die des Akzeptors und die Emissionswellenlänge des Donors zumindest einem Teil der Anregungswellenlänge des Akzeptors entsprechen (spektrale Überlappung). Als Fluoreszenztags wurden CFP und YFP

ausgewählt. Für die Untersuchungen wurde die FRET-Messung nach Ausbleichen des Akzeptors gewählt. Das Prinzip dieser Methode ist in Abb. 2.2 dargestellt.

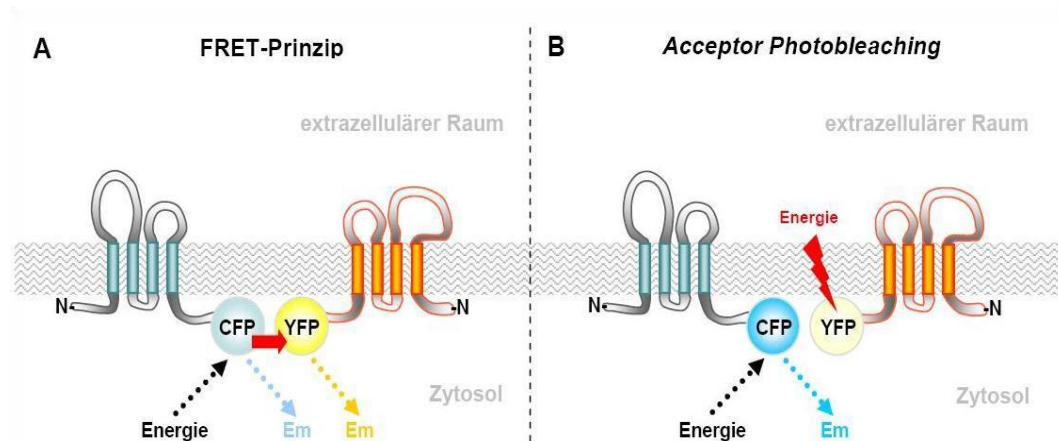


Abb. 2.2: Prinzip der Molekülinteraktion bei FRET-Messungen mit Ausbleichen des Akzeptors. A: Anregung von CFP (schwarzer Pfeil), CFP-Fluoreszenz (blauer Pfeil) und Energieübertragung an YFP (roter Pfeil) im Falle einer Interaktion (Abstand der Fluophore <math><10\text{ nm}</math>). B: Anstieg des Donor (CFP)-Fluoreszenzsignals durch Löschung des Energieakzeptors (YFP) mittels Bleichen (roter Blitz) im Falle einer Proteininteraktion. Aus: Maria Walter (2010): Charakterisierung des TJ-Proteins Claudin-12. Praxisbericht.

Bei enger räumlicher Nähe ($<10\text{ nm}$, Stokes Radius; Karpova *et al.*, 2003) zweier fluoreszenzgekoppelter Proteine überträgt das CFP-Molekül (Donor) - nach Anregung durch Licht mit der Wellenlänge von 458 nm - einen Teil seiner Energie bei Rückkehr in den Grundzustand an das YFP-Molekül (Akzeptor). Nach Ausbleichen der Fluoreszenz des YFP-Moleküls (Akzeptor) durch einen starken Laserpuls (514 nm) wird diese Energieübertragung gestört und die Energieabgabe des *Donors* erfolgt vollständig durch Fluoreszenz, wobei die Signalintensität von CFP zunimmt (Wouters *et al.*, 1998). Durch das irreversible Bleichen des YFP-Signals am Zell-Zellkontakt (Day *et al.*, 2001) muss für jede Messung ein neuer Kontaktbereich eingestellt werden. Das Bleichen des YFP-Signals führt zu einem geringen Bleichen des CFP-Signals. Aufgrund dieser Tatsache werden FRET-Effizienzen oft unterschätzt (Chen *et al.*, 2007).

Die praktische Durchführung der Messung erfolgte, indem vierkanalige Bilder der Zell-Zellkontaktbereiche generiert wurden. Mit dem ersten Kanal wurde das CFP-Signal, mit dem zweiten Kanal das YFP-Signal aufgenommen. Es folgte das Bleichen der YFP-Fluoreszenz durch eine Laserintensität von 100% kurz vor Detektion mit dem dritten Kanal. Schließlich wurde im vierten Kanal erneut das CFP-Signal aufgenommen. Pro Messung wurde dies fünfmal wiederholt, bis das YFP-Signal auf mindestens 10% seiner Ausgangsintensität geblieben war. Für die Auswertung wurde die Signalstärke beider Fluoreszenztags

über die fünf Wiederholungen graphisch dargestellt. Die schematische Darstellung einer solchen Messung zeigt die Abb. 2.3:

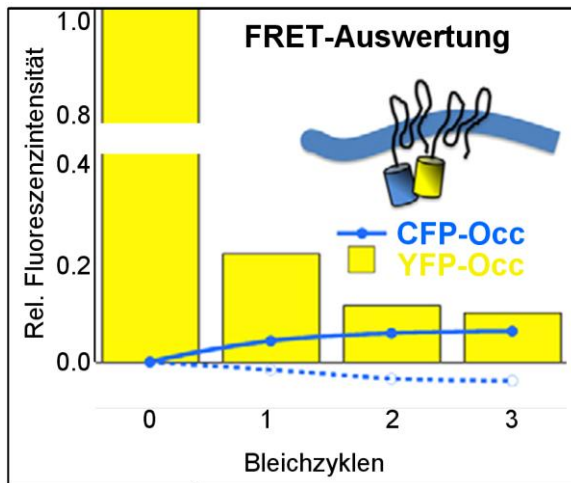


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Datenanalyse bei FRET-Messungen mit Ausbleichen des Akzeptors. Die gelben Säulen zeigen die Intensität des YFP-Signals vor und während der Bleichzyklen (Abzisse) an. Die blaue Linie stellt die Entwicklung des CFP-Signals während des Bleichens dar. Steigt die Fluoreszenz von CFP nach Bleichen von YFP an (blaue Linie), wird von einer Interaktion ausgegangen. Die gepunktete blaue Linie zeigt die Datenlage ohne FRET-Signal. Occ, Occludin. Abbildung modifiziert nach Yaffe *et al.*, 2012.

Die Berechnung der FRET-Effizienz erfolgte durch: $E_F = ((I_A - I_B) \times 100) / I_A$, wobei: E_F : FRET-Effizienz, I_A : CFP-Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen, I_B : CFP-Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen. Die Berechnung der relativen FRET-Effizienz erfolgte durch Division der jeweils gemessenen FRET-Effizienz mit der des internen Standards (CFP-Occ^{wt}/YFP-Occ^{wt}). Als Negativkontrolle dienten FRET-Messungen zwischen Occludin^{wt} und CRFR-1.

Direkte Interaktionen können durch FRET-Messungen nicht nachgewiesen werden. Der Energietransfer wird mit verringertem Abstand der Fluoreszenzmoleküle voneinander zunehmend effizienter. Ein FRET-Signal zeigt demnach die enge räumliche Nähe der Fluoreszenztags und damit der gekoppelten Proteine zueinander an. Je näher sich die zu untersuchenden Proteine zueinander befinden umso höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion.

2.3.11 Mobilitätsuntersuchungen (*fluorescence recovery after photobleaching*)

Eine experimentelle Ergänzung der FRET-Messung ist die FRAP-Messung (Poo and Cone, 1973) zur Mobilitätsbestimmung fluoreszenzmarkierter Proteine in der Plasmamembran. Es wird davon ausgegangen, dass die Mobilität je größer ist, desto geringer das Protein zu Dimer-, Trimer-, Tetramerbildung bzw. zur Bildung von höheren Polymerisierungsstufen neigt. Ursache ist die verminderte Diffusion größerer Partikel in der Lipiddoppelschicht (Gambin *et al.*, 2006).

2. Material und Methoden

Im Gegensatz zur FRET-Messung bedarf es für FRAP-Untersuchungen nur der Monotransfektion des zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Proteins. Es wird das Fluoreszenzsignal des YFP-Occludinkonstruktes am Zell-Zellkontakt von HEK-293-Zellen betrachtet. Nach fünf initialen Bildern, zur Ermittlung der durchschnittlichen Signalstärke in der Bleichregion vor dem Bleichen, wurde das YFP-tag innerhalb eines Bereiches des Zell-Zellkontaktes durch einen starken Laserpuls der Anregungswellenlänge von YFP (514 nm) ausgebleicht. Anschließend wurden zur Detektion und Quantifizierung der Fluoreszenzentwicklung im geblichenen Bereich 95 Bilder (ein Bild alle 2 s) aufgenommen (siehe Abb. 2.4).

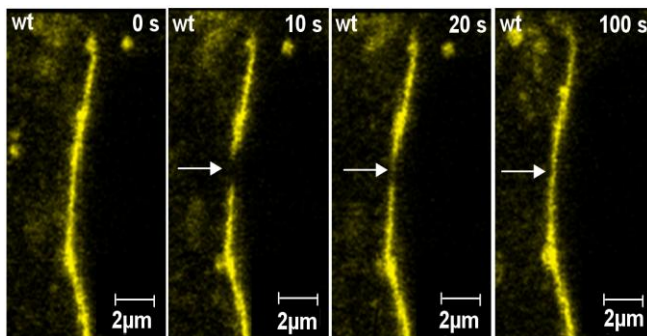


Abb. 2.4: Bleichen und Fluoreszenzrückkehr bei der FRAP-Messung. Die Pfeile zeigen auf die Rückkehr des YFP-Signals in die Bleichregion eines Zell-Zellkontaktes zwischen zwei transient YFP-Occludin-Wildtyp (wt)-transfizierten HEK-293-Zellen.

Je schneller das Signal zurückkehrt, desto höher ist die Mobilität des betrachteten Occludinkonstruktes und desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit für Oligomerisierung (Gambin *et al.*, 2006; Naji *et al.*, 2007). Durch das Bleichen wird die Fluoreszenzeigenschaft des Fusionsproteins, nicht aber das Protein selbst zerstört. Die Fluoreszenzrückkehr (Abb. 2.5) hängt somit nur von der Mobilität der in die Bleichregion diffundierenden, die geblichenen Moleküle verdrängenden Fusionsproteine ab. Die Erstellung der Grafik für die normierte Fluoreszenzrückkehr (bezogen auf die Fluoreszenzstärke vor dem Bleichen) erfolgte mit einem Makro für Microsoft Excel. Die Konstruktion einer durch den Nullpunkt verlaufenden Tangente ermöglicht die Quantifizierung der Initialgeschwindigkeit. Für den Vergleich der Occludinvarianten untereinander und zu Kontrollproteinen mit geringer (Claudin-1) bzw. hoher Mobilität (CRFR) erfolgte die Berechnung der relativen Initialgeschwindigkeit durch Bezug auf Occludin^{wt}.

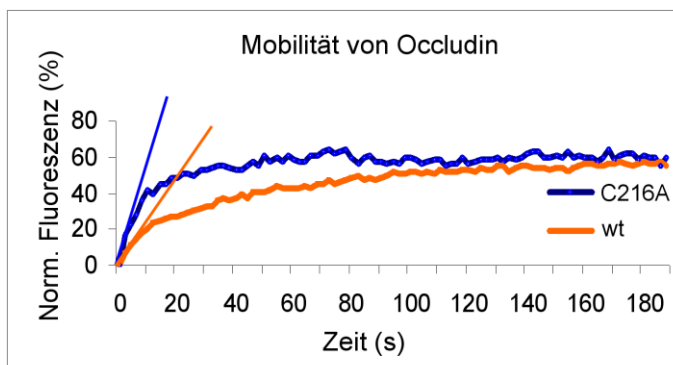


Abb. 2.5: Quantifizierung der FRAP-Messungen. Norm, normiert.

2.3.12 Dichtheitsmessungen (TEER-Messungen und Cellmask-Diffusionsassay)

Bei der TEER-Messung wird der elektrische Widerstand gemessen, den ein auf Filtermaterial (Merck-Millipore) wachsender Zellrasen für einen angelegten elektrischen Strom bildet. Veränderungen dieses Parameters zwischen verschiedenen Zelllinien kommen durch die Proteinzusammensetzung der TJs zustande, welche den parazellulären Ionenflux regulieren. Es wurden MDCK-II-Zellen durch Transfektion von Occludinvarianten oder *knockdown* von Occludin in der TJ-Expression verändert. Es wurde gemessen, welcher Anteil eines auf einer Seite des Zellrasens angelegter elektrischer Strom auf der anderen Seite ankommt.

Bei der Untersuchung der Dichtheit durch den Cellmask-Diffusionsassay (Piontek *et al.*, 2011) wurden HEK-293-Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren endogen keine TJs und bauen daher keinen elektrischen Widerstand auf. Durch die gezielte Transfektion dieser Zellen mit TJ-Proteinen kann der Einfluss eines einzelnen Proteins auf die parazelluläre Dichtheit untersucht werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass der eingesetzte Cellmask-Farbstoff (0,4 µg/ml) dicht geschlossene Zell-Zellkontakte schlechter erreichen kann und eine Färbung im Vergleich zu der restlichen Plasmamembran erst zeitlich verzögert auftritt. Für die Bestimmung der Abdichtungsfunktion eines bestimmten Proteins war demnach entscheidend, ob und wie verzögert der Cellmask-Farbstoff die Plasmamembran am Zell-Zellkontakt im Vergleich zur restlichen Zellmembran anfärbte. Quantifiziert wurde die Ausbildung der Cellmask-Diffusionsbarriere durch Berechnung der Cellmask-Barriererate (CBR) nach 20 min Cellmask-Inkubation. Sie berechnet sich aus: $CBR = I_{K1} / I_{K2}$, wobei I_{K1} , Cellmask-Signalintensität der Kontaktmembranen einer transfizierten und einer untransfizierten Zelle; I_{K2} , Cellmask-Signalintensität der Kontaktmembranen zweier transfizierter Zellen.

2.3.13 Gefrierbruchelektronenmikroskopie

HEK-293-Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen (25 cm²) mit einer Konfluenz von ca. 80-90% ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von Claudin-1 und/oder den Occludinvarianten. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h im Brutschrank kultiviert und dann fixiert. Dafür wurden die Zellrasen zweimal mit PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und mit 5 ml Fixierlösung (1 ml Glutaraldehyd 25%, 9 ml PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺) für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) wurden die Kulturflaschen vollständig mit PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) befüllt und im Kühlraum

gelagert. Die Gefrierbrüche sowie die elektronenmikroskopische Untersuchung der Proben wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. Wolburg aus Tübingen durchgeführt (Mack und Wolburg, 2006).

2.4 Sequenzalignements

Zur Identifikation hochkonservierter AS wurden Sequenzalignements der Occ-Aminosäuresequenz von 15 Spezies durchgeführt (Abb. A1). Es wurde das Programm Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) verwendet. Mittels JalView wurden spezielle AS farblich gekennzeichnet (dunkelgrün: Alanin; hellblau: Tyrosin; grau: Prolin; gelb: Cystein). Die übrigen AS wurden basierend auf chemischen Eigenschaften unterschiedlich farbig dargestellt (grün: unpolar/hydrophob; dunkelblau: basisch; rot: sauer; lila: polar/neutral).

2.5 Molekulare Modellierung

Um sich einen Überblick über die molekulare Struktur der EZS2 von Occludin zu verschaffen wurde iterativ vorgegangen. Zunächst wurden die Primärstruktur sowie grundlegende biochemische Informationen und Sequenzbesonderheiten durch die UNIPROT-Datenbank dargestellt. Humanes Occludin wird unter der Referenznummer Q16625 geführt. Die Sequenz dieser Region (AS 193-243) wurde dann unter Zuhilfenahme des *threading assembly refinement algorithm* (Roy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008) vom I-TASSER-Server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) der Universität Michigan (USA) modelliert. Die Anwendung generiert dreidimensionale Strukturen durch Abgleich der gesuchten Aminosäuresequenz mit Datenbanken von neun Modellierungsprogrammen (FFAS, HHsearch, MUSTER, PPA, PRC, PROSPECT2, SAM-T02, SP3, and SPARKS). Unterstützend dazu wurden mit den online verfügbaren, frei erhältlichen Programmen NetPhosK 1.0 und NetPhosK 2.0 Expositionstests einzelner AS durchgeführt, um potentiell exponierte Reste zu identifizieren. NetPhosK 1.0 und NetPhosK 2.0 stellt das *Center for Biological Sequence Analysis* der Technischen Universität Dänemark zur Verfügung (Blom *et al.*, 1999). Es wurde das Modell ausgewählt, welches den höchsten Konfidenzwert hatte und mit den experimentellen Daten am besten übereinstimmte.

2.6 Statistik

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe der Programme Excel, aus den *Microsoft Office*-Paketen 2003 und 2007 sowie dem Programm *Prism Graph Pad* durchgeführt. Angegeben sind absolute oder relative Mittelwerte und der Standardfehler (SEM). Signifikanzen wurden durch den Mann-Whitney-Test bestimmt. Es werden die Signifikanzniveaus $p < 0,001$ (***/###), $p < 0,01$ (**,##) und $p < 0,05$ (*,#) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Redoxsensitivität von Occludin

3.1.1 Occludin reagiert sensitiv auf oxidativen Stress

Wird YFP-Occludin in HEK-293-Zellen transfiziert, ergibt sich eine vorwiegend membranale Expression des Konstruktes und es finden sich zahlreiche Kontaktanreicherungen zwischen transfizierten Zellen (Abb. 3.1). Um weitere Informationen darüber zu erhalten, wie Occludin auf pathologische Bedingungen und damit auf veränderte Redoxverhältnisse reagiert, wie es z.B. bei Schlaganfall, entzündlichen Prozessen und verschiedenen bakteriellen Infektionen (Feldman *et al.*, 2005) der Fall ist, wurden diese Verhältnisse durch Hypoxie im Vergleich zu Normoxie simuliert. Mit Hilfe des Membranmarkers Trypanblau konnte gezeigt werden, dass monotransfizierte HEK-293-Zellen auf hypoxische Bedingungen mit einer Verringerung von YFP-Occludin in der Zellmembran reagieren (Abb 3.1 unten).

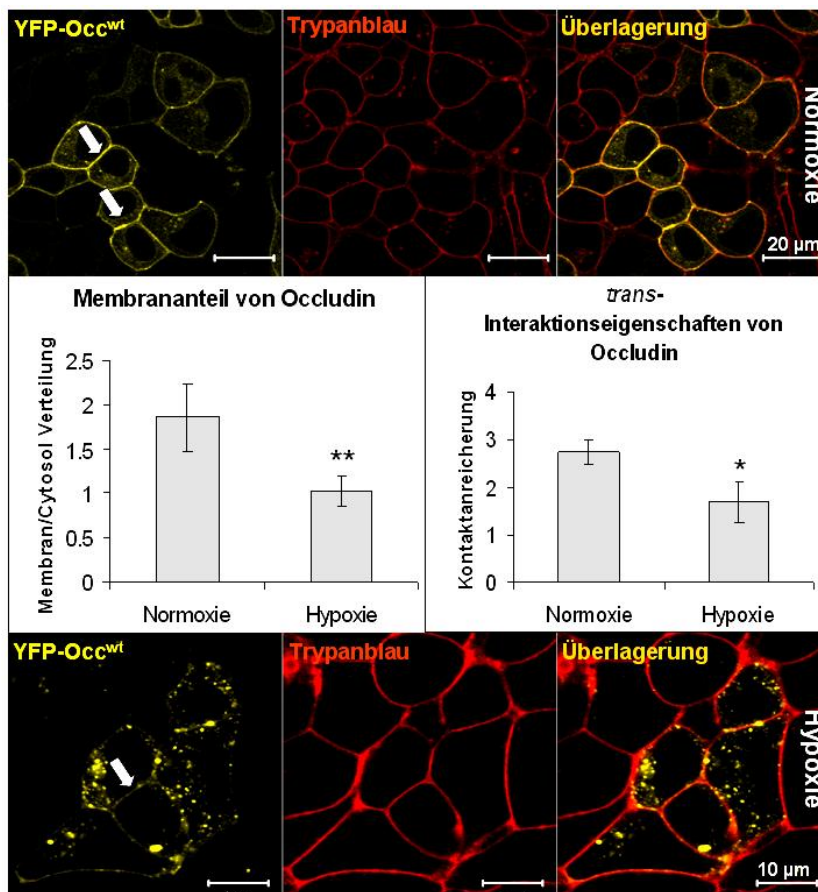


Abb. 3.1: Membranlokalisierung und *trans*-Interaktion von Occludin (Occ) sind redoxsensitiv. Unter Normoxie ist YFP-Occludin (YFP-Occ^{wildtyp (wt)}, gelb) vornehmlich in der Plasmamembran lokalisiert und an den Zell-Zellkontakten zwischen zwei transfizierten Zellen angereichert (Pfeile). Nach 3,5-stündiger Inkubation unter Hypoxie reduzierten sich sowohl die Membranlokalisierung als auch die *trans*-Interaktionen im Vergleich mit der normoxischen Kontrolle. Die Experimente wurden in YFP-Occ^{wt} transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt. Die Fluoreszenz von Trypanblau (rot) wurde verwendet, um die Plasmamembran darzustellen. Mittelwerte±SEM; n≥30 (Membranlokalisierung) und n≥15 (*trans*-Interaktionen); * und ** - p<0,05 bzw. p<0,01, verglichen mit der normoxischen Kontrolle.

Die Membran zu Cytosol-Rate verringerte sich von Normoxie zu Hypoxie von $1,86 \pm 0,38$ auf $1,03 \pm 0,17$. Vergleichbare Auswirkungen der Hypoxie auf die Membranlokalisierung von Occludin zeigten sich auch in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen. Hypoxie führte hier zur Reduktion der Membranlokalisierung um ca. 50%.

3. Ergebnisse

Zwischen zwei transfizierten HEK-293-Zellen war die Fluoreszenzintensität von YFP-Occludin stärker als in den Nichtkontaktbereichen oder in Bereichen zwischen untransfizierten und transfizierten Zellen. Sobald die Fluoreszenzintensität des Kontaktbereiches stärker ist als die Summe der Intensitäten an den Nichtkontaktbereichen oder in den Zellmembranen, die an untransfizierte Zellen angrenzen, handelt es sich um eine Anreicherung. D.h., der Quotient aus Kontaktintensität und Summe von zwei Nichtkontaktintensitäten muss größer als eins sein. Die Kontakthanreicherung wird als interzelluläre *trans*-Interaktion zwischen Occludinmolekülen benachbarter Zellen interpretiert (Bellmann *et al.*, 2013). Die *trans*-Interaktion von YFP-fusioniertem Occludin unter Normoxie betrug in HEK-293-Zellen $2,75 \pm 0,26$ (Abb. 3.1). Nach Inkubation für 3,5 h unter Hypoxie reduzierte sich die Kontakthanreicherung signifikant auf $1,68 \pm 0,43$. Durch Reoxigenierung waren diese Veränderungen reversibel. Ähnliche Verhältnisse waren in MDCK-II-Zellen beobachtbar (nicht gezeigt).

Die beschriebene Umverteilung Occludins unter Hypoxie ist eine spezifische Reaktion dieses Proteins auf hypoxische Bedingungen, da nicht alle transmembranalen TJ-Proteine derart auf hypoxische Bedingungen reagieren (Caraballo *et al.*, 2011).

Bezüglich der *cis*-Interaktionen, also Bindungen innerhalb einer Plasmamembran, war ebenfalls Hypoxiesensitivität nachweisbar (Abb. 3.2).

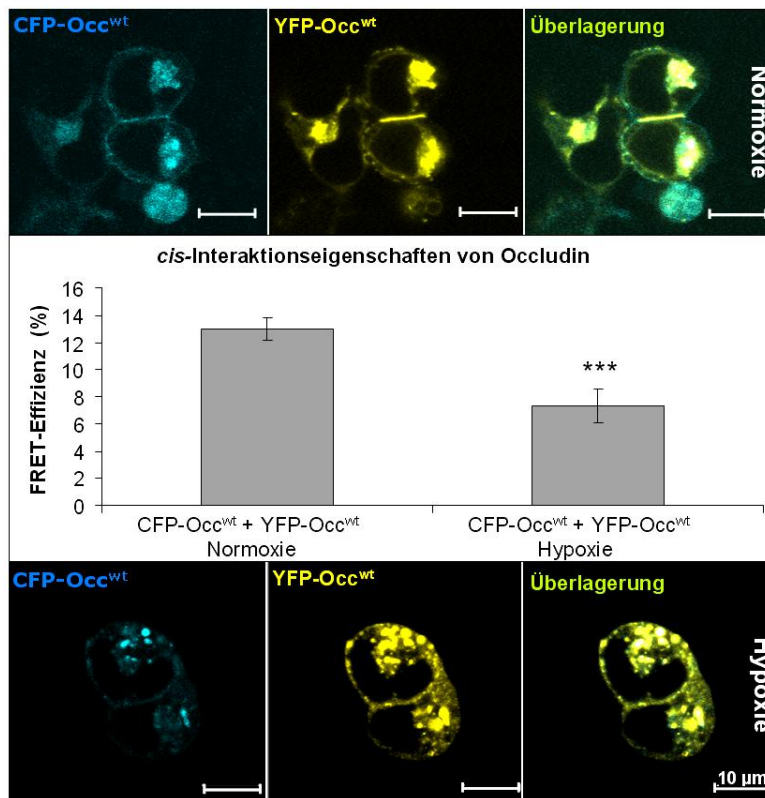


Abb. 3.2: FRET zwischen Occludin (Occ) -Monomeren unter Normoxie und Hypoxie an Zell-Zellkontakten transfizierter HEK-293-Zellen zeigten Redoxabhängigkeit bei der *cis*-Homo-oligomerisierung von Occ. Nach 3,5-stündiger Inkubation der Zellen unter Hypoxie zeigte sich eine reduzierte FRET-Effizienz. CFP (blau) und YFP (gelb) wurden als *tags* mit Occ fusioniert. Mittelwert \pm SEM; $n \geq 26$. ***, $p < 0,001$; verglichen mit der normoxischen Kontrolle.

3. Ergebnisse

In HEK-293-Zellen reduzierte sich die unter Normoxie gemessene FRET-Effizienz des kotransfizierten Paares CFP-Occludin und YFP-Occludin von $12,98 \pm 0,8\%$ nach 3,5-stündiger Exposition der Zellen unter hypoxischer Atmosphäre signifikant auf $7,36 \pm 1,24\%$ (Abb. 3.2).

3.1.2 Cysteinaustauschmutanten induzieren veränderte Occludin-Expressionsmuster, *trans*- und *cis*-Interaktionen und bestimmen in der zweiten extrazellulären Schleife die Redoxsensitivität Occludins

Um zu testen, ob die Ursache für das redoxabhängige Verhalten Occludins in seinen Cysteinresten liegt, von denen humanes Occludin insgesamt sieben aufweist, wurden Cystein zu Alanin-Substitutionsmutanten angefertigt.

Einen Überblick über die Phänotypen der Substitutionsmutanten nach Monotransfektion in HEK-293-Zellen gibt die Abb 3.3 A-C (Normoxie) und F-H (Hypoxie).

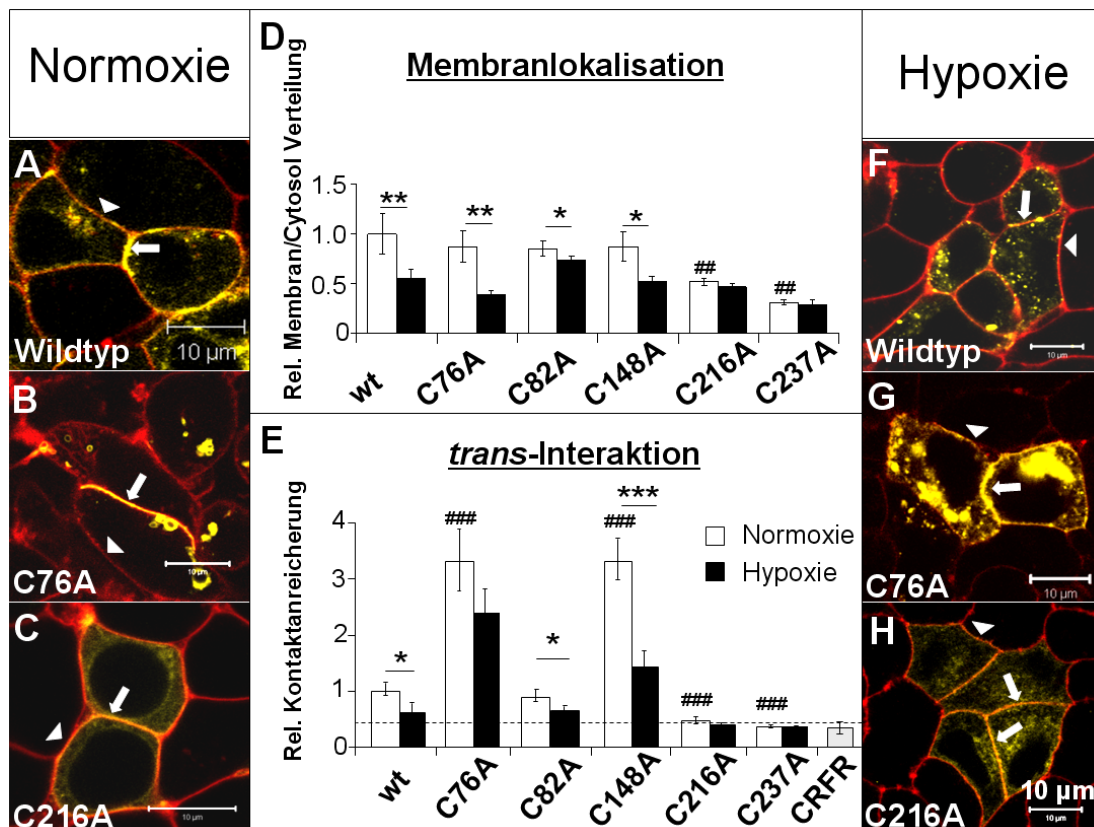


Abb. 3.3: Die Lokalisation von Occludin und seinen Cysteinmutanten sowie seine *trans*-Interaktionen zwischen gegenüberliegenden Zellmembranen waren cysteinabhängig und hypoxiesensitiv. Die Experimente wurden an mit den YFP-Konstrukten (gelb) transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt. Für Konstrukte, die einen ähnlichen Phänotyp erzeugten ist jeweils nur ein repräsentatives Beispiel gezeigt: Wildtyp (wt)-Bilder repräsentieren auch C82A, C76A auch C148A und C216A steht auch für den Phänotyp von C237A. Die Fluoreszenz von Trypanblau (rot) wurde verwendet um die Plasmamembran zu lokalisieren. Pfeile zeigen Zell-Zellkontakte zwischen transfizierten Zellen, Pfeilspitzen die Lokalisation des Konstruktes in der Plasmamembran an. *Corticotropin releasing factor receptor* (CRFR)-1, diente als Negativkontrolle für die *trans*-Interaktionsstudien. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert für *trans*-Interaktionen an. Mittelwert \pm SEM; $n \geq 25$. ##, ###, $p < 0,01$ und $p < 0,001$, verglichen mit dem wt unter Normoxie. *, **, *** - $p < 0,05$; 0,01 und 0,001, verglichen wie angezeigt.

3. Ergebnisse

Der Vergleich der Cysteinmutanten mit dem wt ergab einen unterschiedlichen Einfluss der Cysteine: Unter Normoxie zeigten die Cysteinmutationen der TMD (C76A, C82A, C148A) keinen Effekt auf die Membranlokalisation (Abb. 3.3D). Die Cysteinmutanten in der EZS2, C216A und C237A, wiesen eine statistisch signifikante Reduktion der Lokalisation von Occludin in der Plasmamembran auf. Hier reduzierte sich der Wert der Membran- zu Cytosolrate des wt unter Normoxie ($1,86 \pm 0,38$) um z.T. über 50% (C216A: $0,96 \pm 0,08$; C237A: $0,58 \pm 0,06$). Beide Cysteinmutanten zeigten eine Reduktion von ähnlich starker Intensität verglichen mit dem YFP-Occludin^{wt} und reagierten im Gegensatz zum wt und den Mutanten der TMD nicht auf Hypoxie (Abb. 3.3D). Für die Mutanten der TMD wurde eine signifikante Reduktion der Membranlokalisation im Vergleich von Normoxie zu Hypoxie von $1,6 \pm 0,3$ zu $0,73 \pm 0,07$ (C76A), $1,59 \pm 0,14$ zu $1,36 \pm 0,09$ (C82A) und $1,62 \pm 0,27$ zu $0,96 \pm 0,10$ (C148A) beobachtet. Daraus lässt sich auf eine Redoxsensitivität der Cysteine der EZS2 schließen.

Der normoxische Phänotyp der Cysteinmutanten der EZS2 unterschied sich vom wt unter Hypoxie durch die Ausbildung kleinerer Aggregate und die Umverteilung des Konstruktes ins endoplasmatische Retikulum (ER), wobei eine weitere Fraktion klar membranständig blieb (Abb. 3.4). Beim wt unter Hypoxie zeigte sich hingegen eine Tendenz zur Vesikelbildung (Abb. 3.3F). Diese Beobachtung wurde mittels Kotransfektion der Konstrukte mit einem Marker für das ER (Piontek *et al.*, 2011) und anschließender Bestimmung der Kolo­kalisation von Occludin^{C216A} mit dem ER-Marker getestet (Abb. 3.4). Das Konstrukt war intrazellulär zu nahezu 100% mit dem ER-Marker kolo­kalisiert.

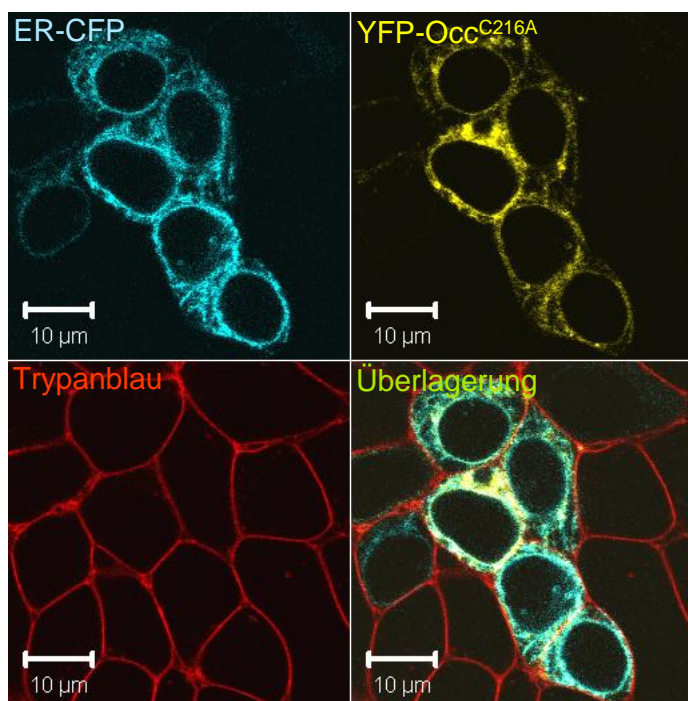


Abb. 3.4: Die Mutanten der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin zeigten eine starke Präsenz im endoplasmatischen Retikulum (ER). Kotransfektion der Mutante YFP-Occludin^{C216A} (gelb) mit einem ER-Marker (blau) zeigte eine starke Kolo­kalisation beider Komponenten. Occludin wurde fusioniert mit YFP in HEK-293-Zellen transfiziert, der ER-Marker war mit CFP fusioniert. Trypanblau (rot) diente als Membranfärbung.

3. Ergebnisse

Die Transfektion der Konstrukte in MDCK-II-Zellen ergab eine ähnliche Charakteristik der Lokalisation der Mutanten der TMD und der EZS2 wie in HEK-293-Zellen. Insgesamt war die Membranlokalisation hier jedoch stärker ausgeprägt (Abb. 3.5). Eine interessante Beobachtung war die Sonderrolle der Mutante C148A. Diese Mutante wies in HEK-293-Zellen eine mit den beiden anderen Mutanten der TMD1 und -2 sowie dem wt vergleichbare Lokalisation in der Plasmamembran auf. In MDCK-II-Zellen lag dieser Parameter im Falle von C148A mit $1,93 \pm 0,27$ deutlich unter dem Niveau dieser Vergleichskonstrukte ($3,83 \pm 0,34$ für wt; $3,68 \pm 0,7$ für C76A und $4,27 \pm 0,45$ für C82A). Ursächlich dafür könnte die endogene Expression zahlreicher weiterer, regulierend auf Occludin einwirkender TJ-Proteine in MDCK-II-Zellen sein.

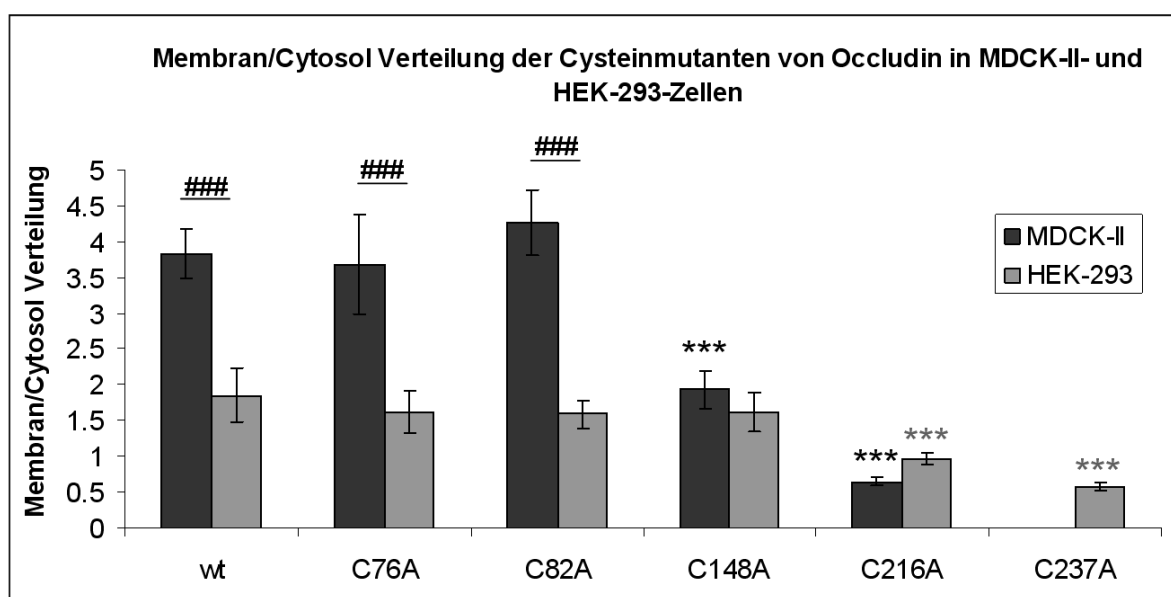


Abb. 3.5: Occludin und seine Cysteinmutanten zeigten sowohl in unpolaren HEK-293- als auch in polaren MDCK-II-Zellen ähnliche zelluläre Lokalisation. Die Membranlokalisation der transmembranalen Cysteinmutationen war im Vergleich zu den Messungen in HEK-293-Zellen um ca. das Doppelte erhöht. Die Mutationen innerhalb der EZS2 zeichneten sich in beiden Zelltypen durch eine im Vergleich mit dem Wildtyp und den Mutanten der TMD reduzierte Membranlokalisation aus. Mittelwert \pm SEM; $n \geq 11$; ***/**** - $p < 0,001$, verglichen mit der jeweiligen Wildtypkontrolle; ### - $p < 0,001$, verglichen wie angezeigt.

Bezüglich der *trans*-Interaktionen war, wie bei der Membranlokalisation, eine einheitliche Wirkung der Mutanten der EZS2 zu erkennen. Sowohl C216A (Anreicherungsfaktor $1,26 \pm 0,12$) als auch C237A (Anreicherungsfaktor $0,97 \pm 0,07$) zeigten im Vergleich zum wt unter Normoxie (Anreicherungsfaktor $2,75 \pm 0,26$) signifikant reduzierte Oligomerisierungseigenschaften (Abb. 3.3E). Ebenfalls vergleichbar mit der Membranlokalisation, führte die 3,5-stündige Inkubation der mit C216A und C237A transfizierten Zellen unter Hypoxie zu keiner Verringerung der *trans*-Interaktion. Die anderen Mutationen zeigten unter Hypoxie reduzierte Werte dieser beiden Parameter.

3. Ergebnisse

Interessant war die scheinbare Behinderung der *trans*-Interaktionen durch die Cysteine an den Positionen 76 und 148 der humanen Sequenz. Diese zeigten nach Substitution zu Alanin signifikant erhöhte Anreicherungsfaktoren (C76A: $9,04 \pm 1,58$ und C148A: $9,02 \pm 1,06$). Die Cysteinmutante C82A unterschied sich nicht signifikant vom wt (Anreicherungsfaktor $2,25 \pm 0,22$; Abb. 3.3E).

In MDCK-II-Zellen fielen die Unterschiede der *trans*-Interaktion des wt und der Mutanten aufgrund der Interferenz des transfizierten YFP-Occludin mit endogenem Occludin geringer aus. Trotzdem war auch hier eine in der Tendenz schwächere Ausprägung der *trans*-Interaktion der Mutante C216A (EZS2) im Vergleich zum wt erkennbar (Abb. 3.6).

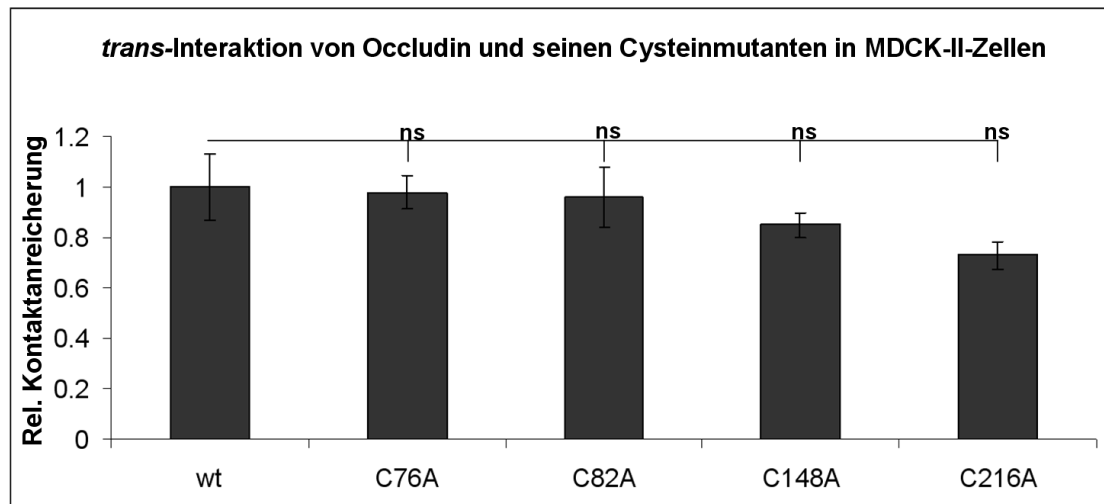


Abb. 3.6: Die Mutation C216A führte in MDCK-II-Zellen zur tendenziell stärksten Reduktion der *trans*-Interaktionen. Relative Mittelwerte \pm SEM; $n \geq 14$.

Nach 3,5 h Inkubation der HEK-Zellen unter Hypoxie wiesen nur die Mutanten der EZS2, C216A und C237A, keine weitere Reduktion der *trans*-Interaktionen auf (C216A: Normoxie zu Anoxie $1,26 \pm 0,12$ zu $1,11 \pm 0,07$; C237A: Normoxie zu Anoxie $0,97 \pm 0,07$ zu $0,96 \pm 0,07$), was abermals - wie schon bei der Untersuchung der Membranlokalisation - auf Redoxsensitivität dieser Cysteine hindeutet (Abb. 3.3E). Die Mutanten der TMD1 und -2 und der wt zeigten unter Hypoxie die typische Reduktion des Anreicherungsfaktors. Die Werte verringerten sich von normoxischen $2,75 \pm 0,26$ zu hypoxischen $1,68 \pm 0,43$ für den wt, $9,04 \pm 1,58$ zu $6,55 \pm 1,06$ für C76A, $2,25 \pm 0,22$ zu $1,63 \pm 0,19$ für C82A und von $9,02 \pm 1,06$ zu $3,93 \pm 0,74$ für C148A.

Das Diagramm in Abbildung 3.7 zeigt, dass die Mutante C82A die *cis*-Interaktion unter Normoxie von $13 \pm 0,8\%$ (wt) auf $8,5 \pm 0,9\%$ reduziert.

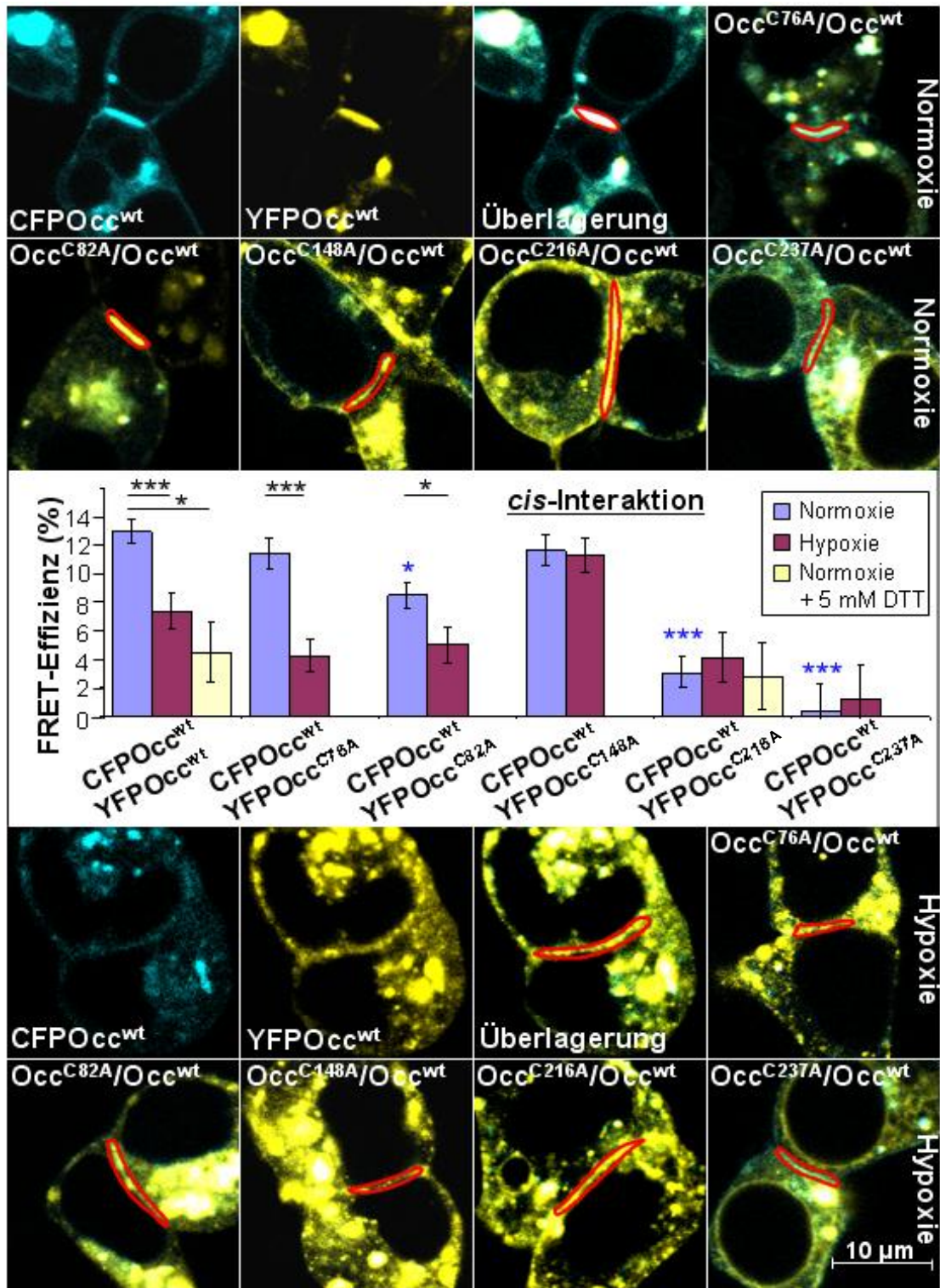


Abb. 3.7: FRET-Messungen von Occludin (Occ) und seinen Cysteinmutanten an Zell-Zellkontakten transfizierter HEK-293-Zellen zeigten eine cytein-, hypoxie- und reduktantienabhängige homophile *cis*-Interaktion. FRET Effizienzen wurden innerhalb der rot markierten Bereiche (Zellkontakte) gemessen. Zur Messung des FRET wurden Occ und seine Mutanten mit CFP (blau) und YFP (gelb) fusioniert. Mittelwerte±SEM; n≥25; blaue Sterne, Signifikanz gegen die Wildtypkontrolle unter Normoxie; schwarze Sterne, Signifikanz gegen das jeweilige Konstrukt unter Normoxie (wie angezeigt); *, *** - p<0,05 und p<0,001.

Die Mutanten C216A und C237A wiesen im Vergleich mit dem wt noch stärker verringerte *cis*-Interaktionen von 3,1±1,1% bzw. 0,35±1,9% auf, während C76A und C148A sich vom wt

3. Ergebnisse

bezüglich der *cis*-Interaktion nicht unterschieden (Abb. 3.7, blaue Säulen und obere Bilder). Die 3,5-stündige Inkubation der HEK-Zellen unter Hypoxie führte wieder nur im Falle der Mutanten C216A und C237A zu nicht weiter reduzierten Werten (C216A: $4,2 \pm 1,7\%$ und C237A: $1,2 \pm 2,5\%$), anders als beim wt ($7,36 \pm 1,24\%$) und den anderen Mutanten ($4,29 \pm 1,09\%$ für C76A; $5,06 \pm 1,26\%$ für C82A; Abb. 3.7 rote Säulen und untere Bilder). Diese beiden extrazellulären Reste scheinen demnach eine Rolle bei der hypoxiesensitiven Oligomerisierung von Occludin zu spielen.

Zusätzlich war die Resistenz der *cis*-Interaktionen gegenüber Hypoxie auch bei der TMD2-lokalisierten Mutante C148A zu beobachten, die unter Normoxie keinen Unterschied zum wt zeigte (Abb. 3.7). Dies wies auf eine protektive Wirkung dieser Mutante unter hypoxischen Bedingungen hin.

Die Sensitivität der Cysteine216 und -237 bestätigte sich durch die Inkubation der Zellen mit 5 mM DTT zur Induktion reduzierender Bedingungen unabhängig von Hypoxie (Abb. 3.7, gelbe Säulen). DTT senkte die FRET-Effizienz der Wildtypmonomere deutlich ab. Ein Einfluss von DTT auf C216A-transfizierte Zellen war nicht zu erkennen.

Die Messung der *cis*-Interaktionen in MDCK-II-Zellen ergab geringere Werte als in HEK-293-Zellen, zeigte jedoch - wie auch in den HEK-293-Zellen - eine signifikante Reduktion durch die Mutante C216A im Vergleich mit dem wt (Abb. 3.8).

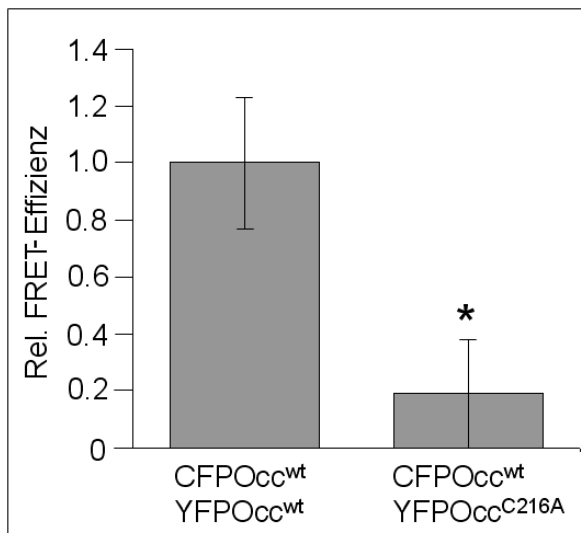


Abb. 3.8: Transfektion der Occludinmutante C216A in MDCK-II-Zellen zeigte bezüglich der Ausprägung der *cis*-Interaktionen am Zell-Zellkontakt ähnliche Ergebnisse wie die Transfektion in HEK-293-Zellen. Die Mutante C216A wies im Vergleich zum Occludin (Occ) Wildtyp (wt) die geringste FRET-Effizienz auf. Mittelwerte \pm SEM; $n > 23$; * $p < 0,05$, verglichen mit der wt/wt-Kontrolle.

Die Ergebnisse der *cis*-Interaktionen spiegelten sich in den Ergebnissen der FRAP-Untersuchungen wider, mit deren Hilfe die Mobilität der Occludinkonstrukte in der Plasmamembran quantifiziert wurde (Abb. 3.9).

3. Ergebnisse

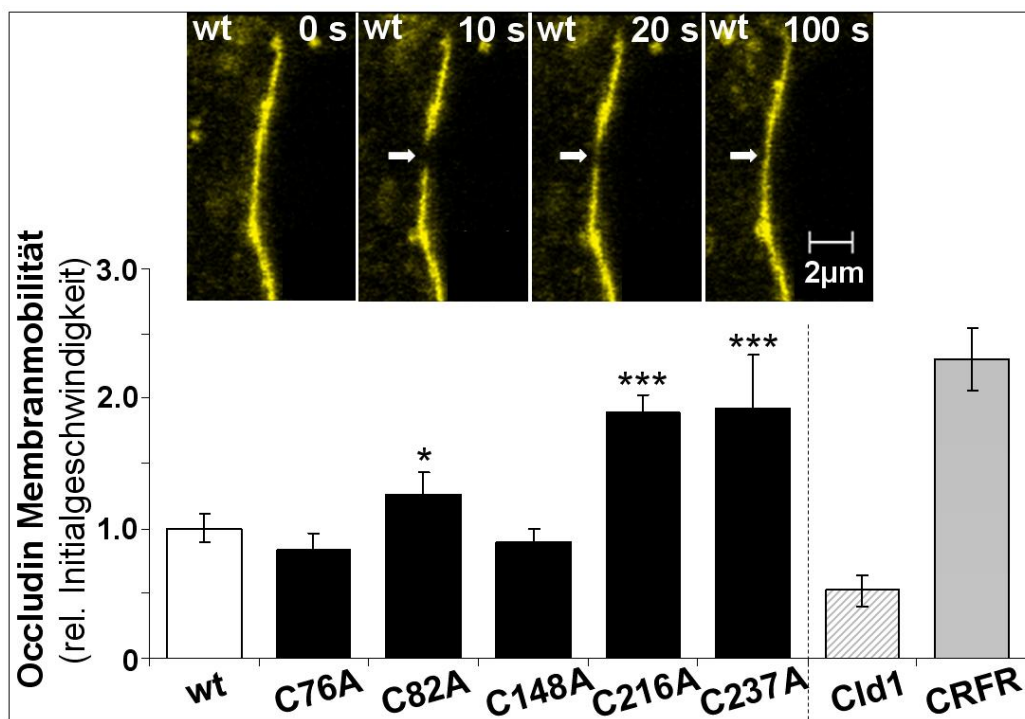


Abb. 3.9: FRAP-Messungen in transient transfizierten HEK-293-Zellen zeigten eine Beeinflussung der Mobilität von humanem Occludin durch Substitution der Cysteine an den Positionen 82, 216 und 237 gegen Alanin. Inset: Rückkehr des YFP-Occludin Wildtyp (wt)-Signals (gelb) nach Ausbleichen eines Bereiches (Pfeil) innerhalb eines Zellkontaktes über die Zeit. Die Mobilität wurde anhand des initialen Anstiegs der Recoverykurve berechnet und ins Verhältnis zum wt gesetzt. *Corticotropin releasing factor receptor* (CRFR) 1 wurde als hochmobiles, Claudin-1 als eher immobiles Kontrollprotein eingesetzt. Mittelwerte±SEM; n≥7; * und *** - p<0,05 und p<0,001, verglichen mit dem wt.

Die Mutanten, welche reduzierte *cis*-Interaktionen und somit eine geringere Oligomerisierung zeigten (C82A, C216A und C237A; Abb. 3.7, blaue Säulen), zeichneten sich durch einen höheren Mobilitätswert (bestimmt als relative Initialgeschwindigkeit verglichen mit dem wt) aus (Abb. 3.9): Für C82A $1,32 \pm 0,18$; für C216A $1,89 \pm 0,13$ und für C237A $1,92 \pm 0,41$. Hintergrund für den Zusammenhang beider Messmethoden ist eine enge Verknüpfung von Mobilität und Proteingröße und damit der Oligomerisierungsstufe (Gambin *et al.*, 2006; Naji *et al.*, 2007). Die beiden anderen TMD-lokalisierten Mutanten zeigten gegenüber dem wt keine Veränderung ($0,84 \pm 0,12$ für C76A und $0,89 \pm 0,11$ für C148A), was ebenfalls konform mit den Ergebnissen der *cis*-Interaktionsbestimmung geht.

Um die Bedeutung der Mutanten C82A und C216A weiter zu ergründen, wurde auch das Paar CFP-Occludin^{C82A} und YFP-Occludin^{C216A} kotransfiziert und mit dem CFP/YFP-Occludin^{wt} Paar bezüglich der FRET-Effizienz verglichen. Sowohl für das Paar CFP-Occludin^{wt}/YFP-Occludin^{C82A} als auch für CFP-Occludin^{wt}/YFP-Occludin^{C216A} wurden reduzierte FRET-Effizienzen ermittelt (Abb. 3.7, blaue Säulen). Die Kotransfektion dieser Mutationen resultierte in einem fast vollständigen Verlust des FRET-Signals (Abb. 3.10), was die Wichtigkeit dieser Reste für die *cis*-Homooligomerisierung betont.

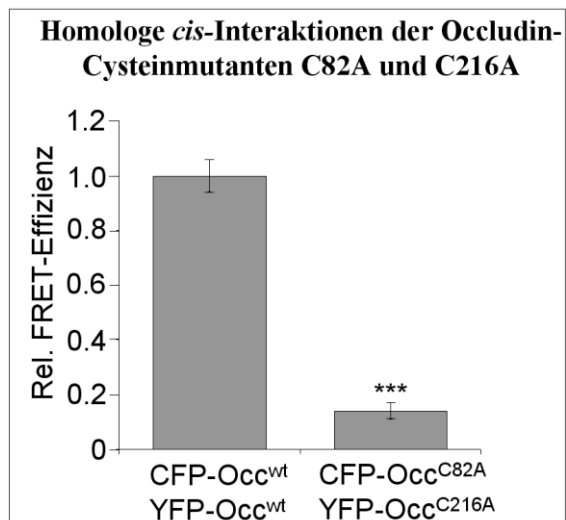


Abb. 3.10: FRET-Messungen in HEK-293-Zellen zeigten, dass die homophilen *cis*-Interaktionen von humanem Occludin (Occ) durch die Cysteine82 und -216 bestimmt werden. Die Messung der FRET-Effizienz zwischen Mutanten ohne die *cis*-interaktionsbestimmenden Cysteine82 und -216 zeigte eine größere Schwächung der *cis*-Interaktionen als die Messung jeweils einer Mutante gegen den Wildtyp (wt). Zur Messung des FRET wurden Occ und seine Mutanten mit CFP und YFP fusioniert. Mittelwerte±SEM; n≥24; *** - p<0,001; verglichen mit dem wt/wt-Paar.

3.1.3 Einfluss von Dithiothreitol auf Occludin und seine Cysteinmutanten

Da Hypoxie zu reduzierenden Bedingungen führt, wurden stabil Occludinvarianten exprimierende HEK-293-Zellen mit 5 mM des Reduktionsmittels DTT behandelt. Dieses im physiologischen Konzentrationsbereich angewendete Reduktionsagens war in der Lage, innerhalb von min seine reduzierende Wirkung auf Occludin auszuüben. Die Reduktion mittels DTT führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen wie unter den durch Hypoxie erreichten reduzierenden Bedingungen. Es wurden der wt sowie die Mutanten der hypoxiesensitiven Cysteine der EZS2 untersucht.

Bereits eine 30-minütige Inkubation der stabil transfizierten HEK-293-Zellen induzierte eine 40%ige Reduktion der Lokalisation von YFP-Occludin^{wt} in der Plasmamembran (Abb. 3.11A). Die Mutanten C216A und C237A (EZS2) zeigten die typische Verringerung der Membranlokalisation ausgehend vom Occludin^{wt}. Eine weitere Delokalisation der Mutanten aus der Plasmamembran nach Applikation von DTT war nicht zu erkennen (Abb. 3.11A und Bilder obere Reihe).

Die DTT-vermittelte Reduktion Occludins wurde auch verwendet, um der Frage nachzugehen, ob es sich bei der beschriebenen, cytosolgerichteten Umorientierung von Occludin unter Hypoxie (siehe Kap. 3.1.1 und 3.1.2) um eine Reaktion des bereits membranständigen Occludins oder eher eine veränderte Faltung während der Neusynthese und inhibierte Membraninsertion handelt. Die Geschwindigkeit der DTT-induzierten Veränderungen spricht gegen die zweite Variante.

Um membranständiges Occludin von seiner Nachlieferung zu entkoppeln und nur den Einfluss der Reduktion auf das membranständige Occludin zu untersuchen, wurden die HEK-Zellen nach Vorinkubation mit Brefeldin für 30 min oder Cycloheximid für 6 h mit DTT

3. Ergebnisse

behandelt. Brefeldin und Cycloheximid sind Blocker des Occludinnachschubes zur Plasmamembran, die durch Akkumulation des neu synthetisierten Occludins im ER (Brefeldin; Klausner *et al.*, 1992) bzw. durch Hemmung der *de novo* Proteinsynthese (Cycloheximid; Dukes *et al.*, 2012) wirken. Die Behandlung mit beiden Blockern zeigte eine relativ lange Stabilität von Occludin in der Plasmamembran und führte auch über 16 h zu keinen morphologischen Veränderungen der Zellen oder zum Zelltod. Gleichzeitige DTT-Inkubation führte binnen min zur Relokalisation Occludins aus der Plasmamembran ins Zellinnere (Abb. 3.11B und Bilder untere Reihe).

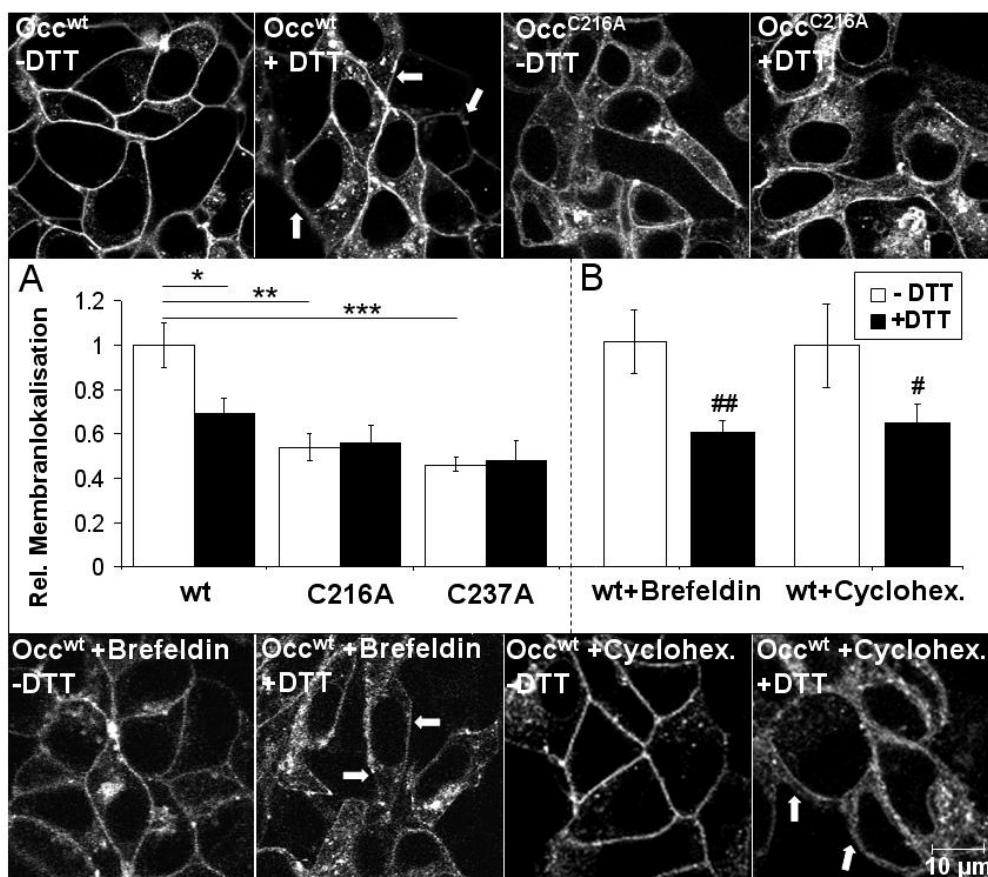


Abb. 3.11: Dithiothreitol (DTT) reduzierte die Membranlokalisation von Occludin (Occ) Wildtyp (wt) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Blockern des Proteinnachschubes zur Zellmembran, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Membranlokalisation der Cystein-Substitutionsmutanten der zweiten extrazellulären Schleife (A). 1 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A (induziert die Festsetzung von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum) und 50 $\mu\text{g/ml}$ des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (Cyclohex.) wurden auf mit YFP-Occ^{wt} transfizierten HEK-293-Zellen für 30 min bzw. 6 h vorinkubiert. Pfeile zeigen reduzierte Membransignale von YFP-Occ 30 min nach Inkubation mit DTT an; Mittelwerte \pm SEM; $n \geq 15$; * bzw. #, ** bzw. ## und *** - $p < 0,05$; $p < 0,01$ und $p < 0,001$, verglichen mit dem DTT freien wt mit Proteinblocker.

Die *trans*-Interaktion von Occludin wurde durch DTT auf $52,9 \pm 9\%$ reduziert, während die Werte für C216A vergleichbar blieben ($31 \pm 3\%$ mit DTT und $32,3 \pm 3\%$ ohne DTT; Abb. 3.12).

3. Ergebnisse

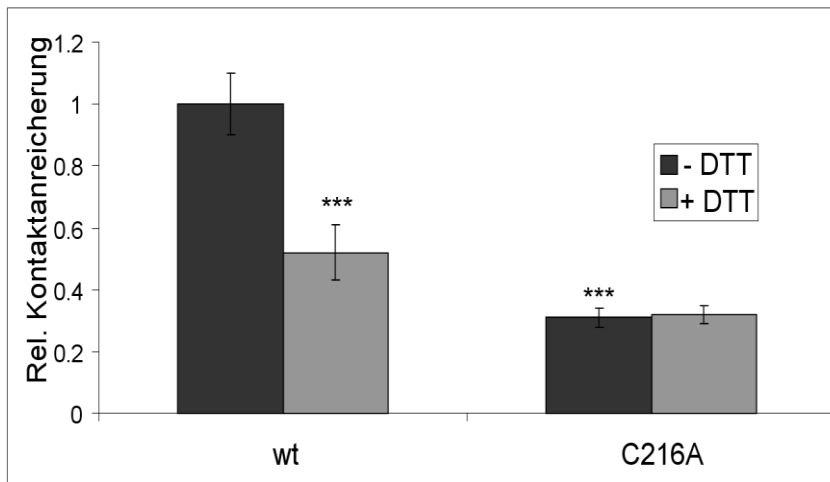


Abb. 3.12: 5 mM Dithiothreitol (DTT) führte nur im Falle des Wildtyps (wt), nicht aber im Falle der Mutante C216A zu einer signifikanten Reduktion der *trans*-Interaktion von stabil transfizierten HEK-293-Zellen. Die Insensitivität von YFP-Occludin^{C216A} spricht für die Redoxsensitivität von Occludin an dieser Stelle. Relative Mittelwerte±SEM; n≥26; *** - p<0,001, verglichen mit dem wt unter Normoxie.

Die *cis*-Interaktion reduzierte sich nach Applikation von DTT auf einen Wert von $0,46 \pm 0,21$, verglichen mit dem wt ohne DTT (Abb. 3.7, gelbe Säulen). DTT führte weiterhin nicht zu einer Veränderung der *cis*-Interaktion von C216A. Dieses Resultat unterstreicht die Annahme der Existenz redoxsensitiver Cysteine innerhalb der EZS2 von Occludin.

3.1.4 Auswirkung veränderter Redoxverhältnisse auf die Dimerisierung von Occludin

Die Mobilitäts- und Oligomerisierungsunterschiede der verschiedenen Occludinkonstrukte führten zu proteinbiochemischen Untersuchungen bezüglich der Varianten von Occludin. Es sollte untersucht werden, ob es noch weitere, evtl. cysteinabhängige und damit hypoxiesensitive Bereiche von Occludin gibt, die zur homophilen Assoziation von Occludinmonomeren beitragen. Als weiteres Ziel sollte die Dimerisierung von Occludin mit unabhängiger Methode belegt werden. Es stellte sich die Frage, ob sich die starken *trans*-Interaktionen der Mutanten C76A und C148A auf die Dimerbildung im SDS-Gel niederschlagen. Weiterhin sollte untersucht werden ob die Cysteinmutationen der EZS2, welche sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Interaktionen und die Membranlokalisation verändern, das Oligomerisierungsverhalten im SDS-Gel beeinflussen würden (Abb. 3.13).

3. Ergebnisse

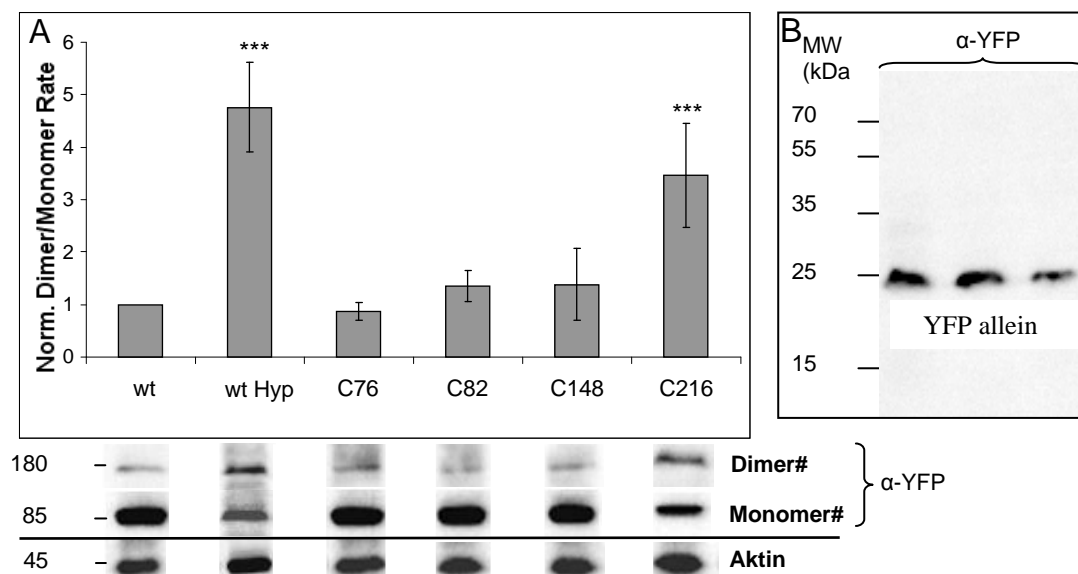


Abb. 3.13: Hypoxie und Cysteinsubstitution zu Alanin an Position 216 (zweite-extrazelluläre Schleife) wirkten sich verstärkend auf die Dimerbildung von Occludin in Lysaten stabil transfizierter HEK-293-Zellen aus. Die anderen Mutanten unterschieden sich in der Dimerisierung nicht vom Wildtyp (wt). B: YFP allein zeigte keine Dimerisierung. Auf wt normalisierte Mittelwerte des Dimer zu Monomer Signals im Western Blot±SEM; n≥7; *** - p<0.001 verglichen mit dem normoxischen wt; #, massenspektrometrisch identifiziert; Aktin diente als *housekeeping gene*; α, anti; MW, *molecular weight* (Molekulargewicht).

Die Untersuchungen zeigten, dass alle Occludinkonstrukte noch dimerisieren. Die Mutationen der TMD zeigten im Western Blot keine Veränderung gegenüber dem wt, während auch mit dieser Methode ein starker Effekt der Mutation C216A aus der EZS2 gezeigt werden konnte. Es wurde eine verstärkte Dimerbande im Verhältnis zum Monomer sichtbar (relative Dimer zu Monomer-Rate von $3,5 \pm 1$ im Verhältnis zum wt unter Normoxie). Ein ganz ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung des Wildtypkonstruktes unter Hypoxie. Auch hier zeigte die Dimerbande im Verhältnis zum Monomer und zur Dimerbande der Normoxie eine stärkere Intensität (Dimer zu Monomer-Rate $4,8 \pm 0,8$ im Verhältnis zum wt unter Normoxie, Abb. 3.13A). Die stärksten Dimerbanden traten demnach bei den Konstrukten oder Bedingungen auf, die zu einer reduzierten Membranlokalisation führten. Um sicherzugehen, dass das Dimer nicht aufgrund einer Interaktion innerhalb des YFP-tags entstand, wurde als Negativkontrolle ein Zelllysate aus nur mit YFP transfizierten HEK-293-Zellen aufgetragen (Abb. 3.13B). Diese Probe zeigte in keinem der durchgeführten Western Blots eine Dimerisierung. Auch nichttransfizierte HEK-293-Zellen dienten als Kontrolle um die Bande des transfizierten Occludins sicher zuordnen zu können. Als weitere Kontrolle für die Bandenzuordnung wurde die massenspektrometrische Untersuchung in Kooperation mit der AG Krause des FMP herangezogen. Diese ergab eine signifikante Zuordnung von zwölf Peptiden zum Occludinmonomer (Tab. 3.1) und von drei Peptiden zum Occludindimer (Tab. 3.2).

3. Ergebnisse

Tab. 3.1: Zusammenstellung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide der YFP-Occludin-Monomerbande

Masse/Ladung	Tatsächliche Masse	Erwartete Masse	Massenabweichung	Sicherheit	Sequenz
403,6791	805,3437	805,3429	1,05	2	R.YPDHMK.Q + Oxidation (M)
411,2007	820,3867	820,3868	-0,06	23	K.QHDEFFK.S
506,7838	1011,553	1011,55	2,8	0,8	K.WTSPPGVIR.I
525,7654	1049,516	1049,514	1,88	0,03	K.FEGDTLVNR.I
607,7878	1213,561	1213,562	-0,36	0,003	R.NFDTGLQEYK.S
637,2909	1272,567	1272,562	4,01	0,001	R.YSSGGNFETPSK.R
641,7915	1281,568	1281,566	1,95	0,0007	K.SAMPEGYVQER.T + Oxidation (M)
667,3237	1332,633	1332,631	-0,02	0,11	R.EYPPITSDQQR.Q
1009,482	2016,949	2016,939	5,14	0,004	K.NVSAGTQDVSPSPSYVER.V
1163,104	2324,192	2324,19	1,05	0,0003	K.STPVPEWQELPLTSPVDDFR.Q
813,0905	2436,25	2436,254	-1,63	0,49	K.GEELFTGVVPIVLVDGDNVNGHK.F

Es konnten elf Peptide nachgewiesen werden, die sich z.T. in YFP und/oder Occludin befinden; gelb, Peptide aus YFP; schwarz, Peptide aus Occludin. Experimentelle Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchung durch Dr. M. Schümann.

Tab. 3.2: Zusammenstellung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide der YFP-Occludin-Dimerbande

Masse/Ladung	Tatsächliche Masse	Erwartete Masse	Massenabweichung	Sicherheit	Sequenz
607,7880	1213,5615	1213,5615	-0,02	0,93	R.NFDTGLQEYK.S
637,2885	1272,5625	1272,5622	0,18	0,00019	R.YSSGGNFETPSK.R
1009,4754	2016,9362	2016,9389	-1,3	0,67	K.NVSAGTQDVSPSPSYVER.V

Es konnten drei Peptide nachgewiesen werden, die sich in Occludin befinden; experimentelle Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchung durch Dr. M. Schümann.

3.1.5 Identifizierung einer in die *cis*- und *trans*-Homooligomerisierung involvierten Disulfidgruppe in der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin

Beide Cysteinmutationen der EZS2 zeigten in allen Assays die gleichen veränderten Eigenschaften. Die Frage war nun, ob und mit welchem Partner diese Cysteine interagieren und welche Struktur- oder Bindungseigenschaften sich dadurch ergeben und/oder verändern. Die Interaktion der intakten Cysteine237 der C216A-Mutante, und entsprechend der intakten Cysteine216 der C237A-Mutante, jeweils miteinander konnte durch die Untersuchung der stabil transfizierten Mutanten in HEK-293-Zellen bereits widerlegt werden (Kap. 3.1.2, Abb. 3.3E).

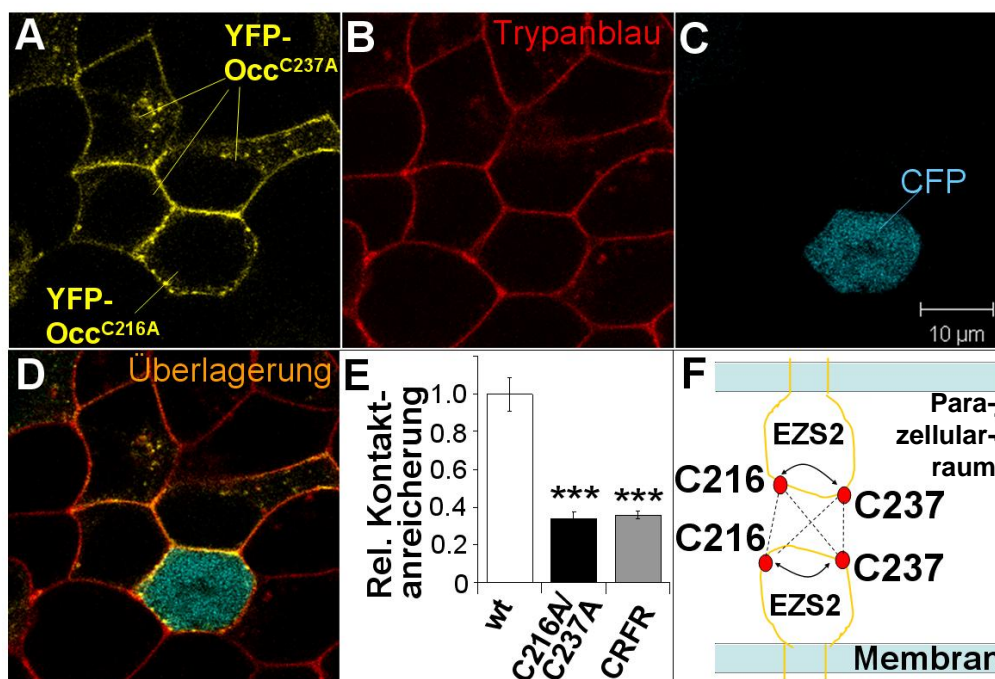


Abb. 3.14: Die Cysteine 216 und 237 von Occludin (Occ) bildeten eine Disulfidbrücke innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife (EZS2). Die Kokultur aus HEK-293-Zellen, die entweder stabil YFP-Occ^{C216A}+CFP allein kotransfiziert oder nur YFP-Occ^{C237A} monotransfiziert waren, zeigte keine Anreicherung von Occ an den Zellkontakten zweier unterschiedlich transfizierter Zellen (A, quantifiziert in E). D.h., Cystein216 in Occ^{C237A} *trans*-interagierte nicht intermolekular mit Cystein237 in Occ^{C216A}. Trypanblau (rot) fungierte als Membranmarker (B) zur Lokalisation des YFP-Occ-Signals (gelb) in der Plasmamembran; CFP (blau) wurde zur Identifikation der YFP-Occ^{C216A}-exprimierenden Zellen eingesetzt (C). D zeigt die Überlagerung aller aufgenommenen Kanäle. F zeigt die hypothetische, intramolekulare Disulfidbrücke innerhalb der EZS2 (Doppelpfeile). Gestrichelte Linie: Keine Interaktion detektierbar. CRFR 1 wurde als Negativkontrolle verwendet. Mittelwert±SEM; n≥18; *** - p<0,001; verglichen mit dem Wildtyp.

Um auszuschließen, dass das intakte Cystein237 in der Mutante C216A und das intakte Cystein216 in der Mutante C237A miteinander interagieren, erfolgte die Anlage einer Kokultur von HEK-293-Zellen, die mit den oben erwähnten Mutanten transfiziert waren (Abb. 3.14A und D). Diese Zellen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Kotransfektion mit CFP allein im Falle der C216A-transfizierten Zellen ermöglichte die Unterscheidung beider YFP-exprimierender Zellpopulationen (Abb. 3.14C und D). Um zu vermeiden, dass Zellen die nur YFP-Occludin^{C216A} exprimierten fälschlicherweise für YFP-Occludin^{C237A}-exprimierende Zellen gehalten wurden, wurde separat kontrolliert, dass mindestens 90% der YFP-Occludin^{C216A}-exprimierenden Zellen auch CFP koexprimierten. Die Kokultur ermöglichte die kreuzweise intermolekulare Interaktion der Cysteinreste (Abb. 3.14F). Sollte die Interaktion also über Kreuz sein, hätte sie im vorliegenden Assay durch Kontaktanreicherung dokumentiert sein müssen. In der beschriebenen Kokultur konnten jedoch keine mit dem wt vergleichbaren Kontaktanreicherungen detektiert werden (Abb. 3.14E). Die quantitative Analyse der Kokultur bezüglich der Kontaktanreicherung ergab einen Anreicherungsfaktor von $0,35 \pm 0,05$, verglichen mit dem wt. Abbildung 3.15 zeigt, dass die durch C237A

induzierten Reduktionen der *trans*- und *cis*-Interaktionen durch das C237S-Konstrukt nicht revidiert werden konnten (Säulen 3 und 6). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme einer intramolekularen Disulfidbrücke innerhalb der EZS2 von Occludin.

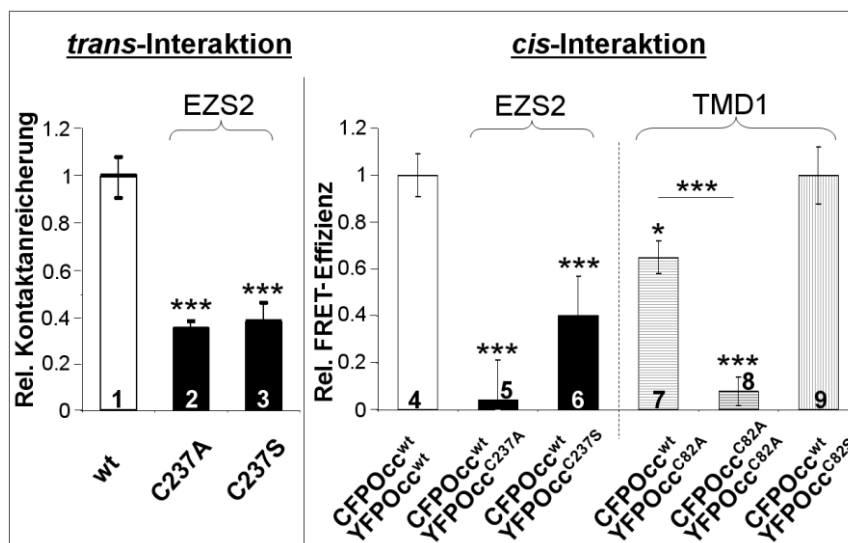


Abb. 3.15: Serinsubstitution des Cysteins 237 (C237S) in der zweiten extrazellulären Schleife (EZS2) von Occludin (Occ) reduzierte die *trans*- und *cis*- Interaktionen von Occ, während die Substitution des Cysteins 82 (TMD1) gegen Serin (C82S) die *cis*-Interaktion nicht beeinflusste. Die *trans*-Interaktion wurde mit Hilfe der Kontakthanreicherung von Occ zwischen zwei transfizierten Zellen quantifiziert. Die *cis*-Interaktion wurde als FRET zwischen einem CFP- und einem YFP-Fusionsprotein (Occ und seine Cysteinmutanten) an Zell-Zellkontakten kotransfizierter Zellen bestimmt. Relative Mittelwerte±SEM; n≥12; * und *** - p<0,05 und p<0,001, verglichen mit dem wt oder der wt/wt Kotransfektion.

3.1.6 Rolle von Transmembrandomänen bei der Homooligomerisierung von Occludin

In Kap. 3.1.2 wurde dargestellt, dass das Cystein82 innerhalb der TMD1 einen Einfluss auf die *cis*-Homooligomerisierung und die Mobilität von Occludin zu haben scheint (Abb. 3.7, Abb. 3.9). Ähnliches gibt Abb. 3.15, Säule 7 wieder. Um herauszufinden ob dieser Rest eine Disulfidbrücke bildet, wurde die Mutante C82A als CFP- und YFP-Fusionsprotein in HEK-293-Zellen kotransfiziert (CFP-Occludin^{C82A}/YFP-Occludin^{C82A}) und die FRET-Effizienz bestimmt (Abb. 3.15, Säule 8). Die Abbildung verdeutlicht, dass die Kotransfektion der Mutante mit dem wt die FRET-Effizienz im Vergleich zur Kotransfektion des Paares CFP-Occludin^{wt}/YFP-Occludin^{wt} auf 65±7% senkte (Abb. 3.15, Säule 7). Die Kotransfektion von CFP-Occludin^{C82A}/YFP-Occludin^{C82A} senkte die FRET-Effizienz im Vergleich zum wt/wt-Paar noch einmal auf 8±6% ab (Abb. 3.15, Säule 8). Dieser additive Effekt spricht gegen die Annahme einer Disulfidbrücke unter Beteiligung von Cystein82, da im Falle einer solchen unerheblich sein sollte, ob nur ein (Kotransfektion wt mit C82A) oder beide Interaktionspartner (Kotransfektion C82A mit CFP sowie YFP) inaktiviert werden.

Um substantielle Veränderungen in der Struktur der TMD1 zu vermeiden und trotzdem eine potenzielle Cystein-Cystein-Assoziation zu blockieren, während die physikochemischen Eigenschaften der Cystein-Seitenketten erhalten bleiben, wurde auch das Cystein82 gegen Serin statt Alanin ausgetauscht. Die Messung der *cis*-Interaktion ergab eine vollständige Normalisierung des Wertes auf das Niveau der CFP- und YFP-Occludin^{wt}-Kotransfektion (Abb. 3.15, Säule 9). Dies war ein weiteres Indiz gegen die Beteiligung des Restes C82 an einer Disulfidbrücke, da allein die strukturelle Ähnlichkeit des Serins mit Cystein ausreichte, um die Wildtypsituation herzustellen. Die Alteration der *cis*-Interaktion durch diesen Rest ist also eher strukturell bedingt und unabhängig von der Ausbildung einer Disulfidbrücke. Vielmehr erscheint für die Assoziation in diesem Bereich eine kleine, ungeladene polare Seitenkette nötig zu sein.

3.1.7 Einfluss von Cysteinmutationen auf die parazelluläre Dichtheit

Von Anderen wurde gefunden, dass Occludin in der Lage ist, die parazelluläre Permeabilität von MDCK-II-Zellen zu verändern (Yu *et al.*, 2005). Um das Phänomen der Veränderung der parazellulären Dichtheit von MDCK-II-Zellen durch Occludin zu untersuchen, wurden TEER-Werte in untransfizierten wt- und Occludin-*knockdown*-MDCK-II-Zellen gemessen (Abb. 3.16).

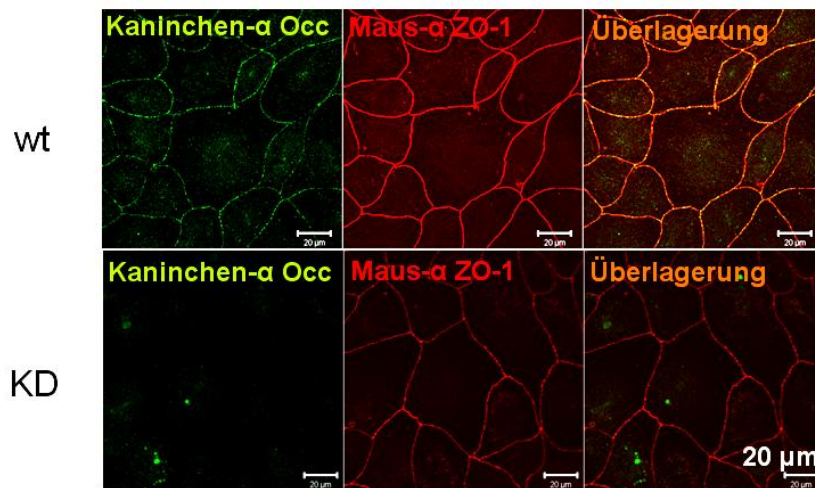
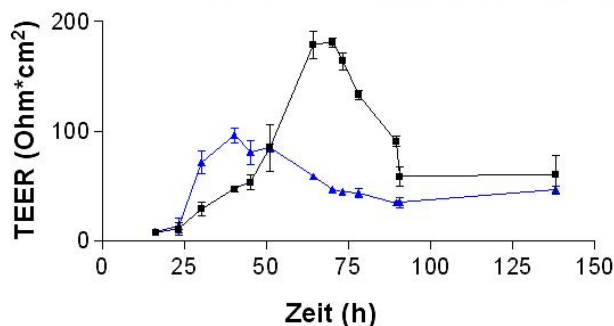


Abb. 3.16: Occludin (Occ) *knockdown* (KD) in MDCK-II-Zellen führte zu einer Reduktion des TEER Maximums um ca. 50%. Wt, Wildtyp. Mittelwerte±SEM; n≥4; grün, Occ; rot, ZO-1; orange, Überlagerung.



3. Ergebnisse

Die stabile Transfektion der Occludin siRNA hatte einen stark verminderten Einfluss auf die Expression des endogenen Occludins (Abb. 3.16, obere Bilder). Beide Zelllinien wiesen den typischen TEER- Verlauf in MDCK-II-Zellen auf. Nach ca. 48-72 h bildete sich in beiden Fällen ein TEER-Maximum aus (wt: $186 \pm 3,8 \Omega$, *knockdown*: $98 \pm 10,2 \Omega$). Auffallend war eine Reduktion des TEER-Maximums bei den Occludin-*knockdown*-Zellen um ca. 50%. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Occludin in der Lage ist die parazelluläre Permeabilität zu beeinflussen. Um feststellen zu können, ob die Veränderungen der Aminosäuresequenz von Occludin durch Cysteinmutation Einfluss auf physiologische Eigenschaften der TJ ausübt, wurden MDCK-II-Zellen stabil mit FLAG-Occludinkonstrukten transfiziert und deren parazelluläre Dichteheit bestimmt. Dazu wurden die Cysteinmutanten ausgewählt, die zu Veränderungen in den *trans*-, *cis*- und/oder Mobilitätsuntersuchungen führten. Ein Einfluss verschiedener Expressionsgrade zwischen den Occludinvarianten wurde ausgeschlossen, indem die exprimierte Menge von Occludin in den stabil transfizierten Linien durch Western Blots kontrolliert wurde (Abb. 3.17, Inset).

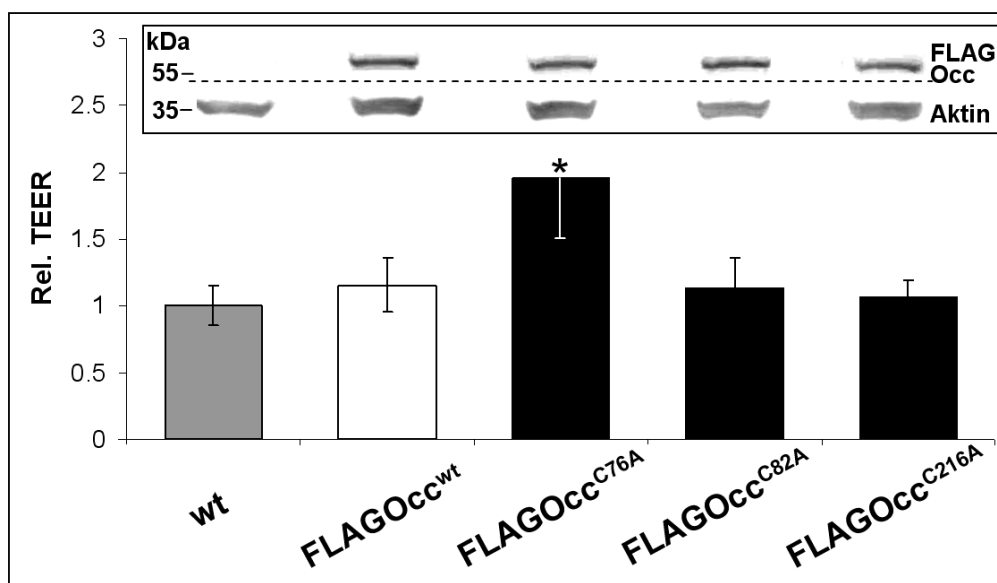


Abb. 3.17: Die Substitution von Cystein gegen Alanin an Position C76 in TMD1 von Occludin (Occ) führte zu einem Anstieg der parazellulären Dichteheit von MDCK-II-Zellen. Messungen des TEER in stabil FLAG-Occ transfizierten MDCK-II-Zellen. Das Inset zeigt Immunoblots der transfizierten FLAG-Konstrukte, nachgewiesen über das FLAG-tag. Aktin wurde als *house keeping*-Protein verwendet. wt, Wildtyp; relative Mittelwerte \pm SEM; $n \geq 4$; * - $p < 0,05$, verglichen mit dem wt.

Abbildung 3.17 verdeutlicht, dass Zellen, die mit FLAG-Occludin^{wt} transfiziert wurden, bei Konfluenz leicht höhere TEER- Werte ausbildeten ($145 \pm 23,1 \Omega$; $n=17$) als Zellen, welche nur endogenes Occludin exprimierten ($124 \pm 14,4 \Omega$; $n=17$). Der Vergleich der exogen exprimierten Occludinvarianten ergab einen signifikanten Anstieg der parazellulären Dichteheit im Falle der FLAG-Occludin^{C76A}-Mutante. Mit dieser Mutante wurden im Vergleich zum wt mit

243±60.3Ω (n=4) nahezu doppelt so hohe TEER-Werte erreicht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den für diese Mutante gemessenen erhöhten *trans*-Interaktionswerten (stärkere Anreicherung am Zellkontakt) und zeigt, dass das Cystein76 an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt ist. Die Mutanten C82A und C216A hatten mit 140±25.7Ω (n = 6) und 131±9.7Ω (n=8) keinen signifikanten Einfluss auf die parazelluläre Dichtheit.

3.1.8 Occludin veränderte die phänotypischen Strangeigenschaften von Claudin-1

Oben wurde gezeigt, dass Occludinmutanten die parazelluläre Permeabilität beeinflussen konnten. Um zu untersuchen ob es sich dabei um einen direkten oder claudinvermittelten Effekt handelt, wurde im Folgenden die Auswirkung der Mutationen auf das umfassend exprimierte Claudin-1 betrachtet.

Um herauszufinden wie Cystein76 stärkere *trans*-Interaktionen (Abb. 3.3E) und eine höhere parazelluläre Dichtheit (Abb. 3.17) induziert, wurde sein Einfluss auf Claudin-1-basierte Stränge mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie näher untersucht. Dazu wurde Occludin allein, Claudin-1 allein oder Claudin-1 jeweils zusammen mit verschiedenen Mutantenkonstrukten von Occludin transient in HEK-293-Zellen transfiziert (Abb. 3.18).

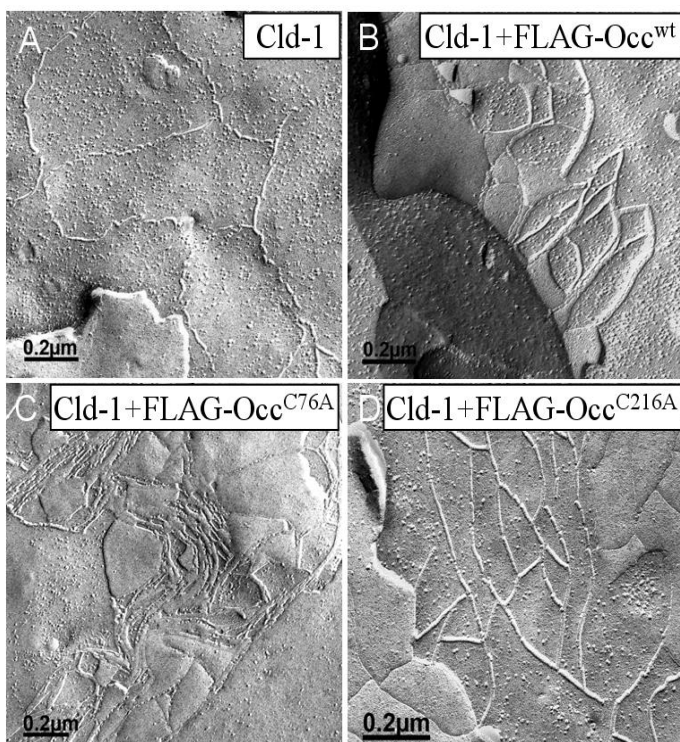


Abb. 3.18: Die Substitutionsmutation C76A in Occludin (Occ), kotransfiziert mit Claudin-1 (Cld-1) in HEK-293-Zellen, führte zu einer Veränderung der Strangmorphologie von Cld-1. Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen der transfizierten HEK-293-Zellen. Durchführung der Gefrierbrüche und Aufnahme der Bilder in Kooperation mit Prof. Dr. H. Wolburg, Tübingen.

Claudin-1 allein zeigte kontinuierliche Stränge und Maschen in der *P*-face (protoplasmatische Seite der Plasmamembran). Der Durchmesser dieser Maschen betrug ca. 0,4-0,6 μm (Abb.

3.18A). Wurde Claudin-1 mit Occludin^{wt} kotransfiziert, erschienen die Stränge komplexer, der Maschendurchmesser verringerte sich auf ca. 0,2 μm und die Assoziation der Stränge mit der *P-face* nahm zu (Abb. 3.18B). Weiterhin erschien die Form der Maschen ovaler als bei den Claudin-1-monotransfizierten Zellen. Occludin monotransfizierte Zellen zeigten keine Strangbildung in HEK-293-Zellen (nicht dargestellt). FLAG-Occludin^{C76A} führte zu längeren und dichter gepackten TJ-Strängen (Abb. 3.18C).

Die dichtere Packung der Stränge könnte auf den in Kap. 3.1.2 dargestellten, verstärkten *trans*-Interaktionen dieser Mutante basieren, was auch die höhere parazelluläre Dichtigkeit dieser Mutante erklären würde. Die Mutante FLAG-Occludin^{C216A} (EZS2), kotransfiziert mit Claudin-1, führte zu ähnlicher Strangorganisation wie bei Claudin-1 kotransfiziert mit FLAG-Occludin^{wt} (Abb. 3.18D). Insgesamt bildete Occludin selbst keine Stränge, aber stabilisierte und organisierte Claudin-1-basierte Stränge.

3.1.9 *In silico*- Modellierung der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin

Um eine Vorstellung davon zu erhalten, wie die EZS2 von Occludin räumlich strukturiert ist, modellierten wir diesen Bereich (AS 196-243). Die auf Basis von Sequenzhomologien und experimentellen Resultaten ermittelte Struktur besteht aus einer α -Helix sowie zwei β -Strängen (Abb. 3.19).

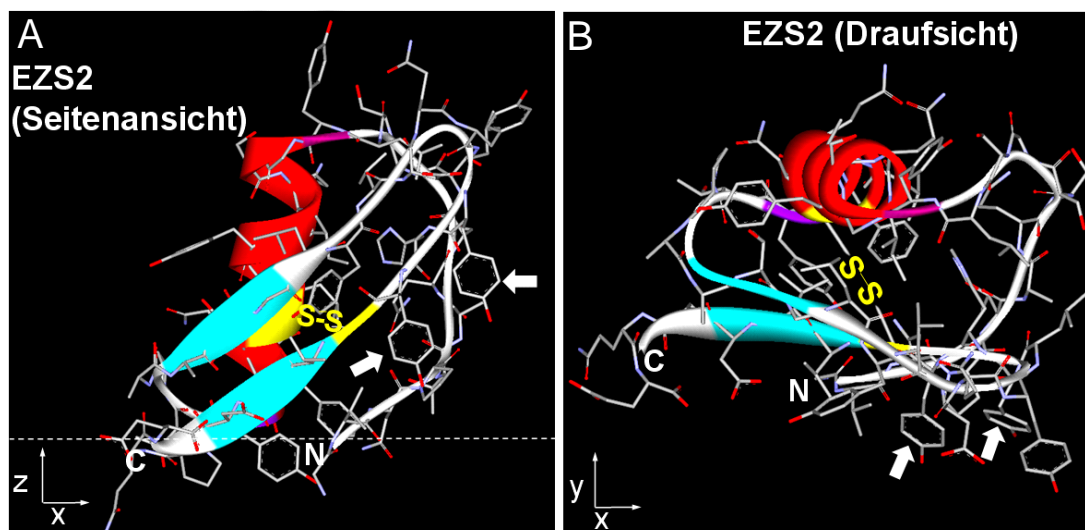


Abb. 3.19: *In silico*-Modellierung der zweiten extrazellulären Schleife (EZS2) von Occludin (Occ) zeigt eine α -Helix und zwei β -Stränge, die sich gegenseitig durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Resten Cystein216 und -237 stabilisieren und ein Falblatt bilden. Seitenansicht (A) und Draufsicht (B) auf die dreidimensionale Struktur der EZS2 von Occ¹⁹⁶⁻²⁴³. Durch diese Orientierung wird dem parazellulären, wässrigen Umfeld eine potentielle Interaktionsdomäne exponiert, die sehr reich an Aromaten ist. S-S (gelb) symbolisiert die Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys216 und Cys237 (gelb); die Pfeile sind auf potentiell bindungsfördernde Aromaten gerichtet (Yaffe *et al.*, 2012). Gestrichelte Linie, Membranoberfläche; rot, α -Helix; blau, β -Strang; gelb, Cysteine.

Die β -Stränge liegen in einer antiparallelen Orientierung. Beide Cysteine sind eng benachbart und bilden eine abgeschirmte Disulfidbrücke. Das daraus resultierende β -Faltblattstruktur beinhaltet zahlreiche aromatische AS, welche, wie z.T. vermutet (vgl. Yaffe *et al.*, 2012), als Bindungsreste fungieren könnten.

3.1.10 Zweite extrazelluläre Schleife und Transmembrandomäne 1 - Bindungsareale für die Homooligomerisierung von Occludin

Basierend auf unseren Untersuchungen sowie Literaturdaten (Walter *et al.* 2009; Yaffe *et al.*, 2012) wurde ein Bindungsschema zur Homooligomerisierung von Occludinmonomeren erarbeitet (Abb. 3.20). Die Abbildung zeigt, dass eine Disulfidbrücke innerhalb der EZS2 die *trans*- und *cis*-Interaktionen von Occludin indirekt beeinflusst. Weiterhin sollte mit der Abbildung eine direkte Beteiligung des Cystein82 an der Interaktion zwischen den TMD1 zweier verschiedener Occludinmoleküle sichtbar gemacht werden.

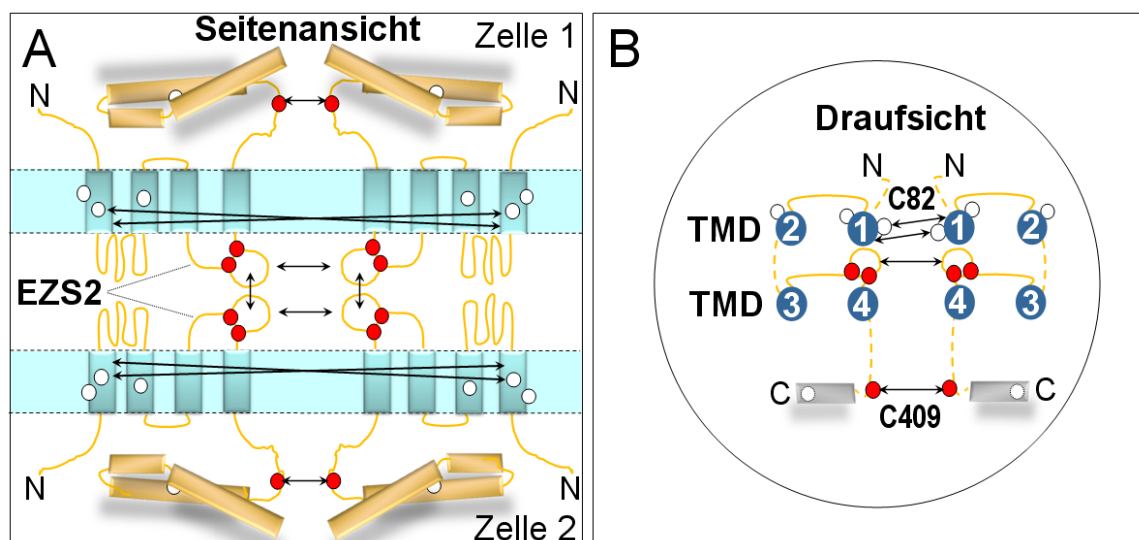


Abb. 3.20: Vermutete Bindungsareale für die homophile Oligomerisierung von Occludin (Occ) unter besonderer Berücksichtigung von Cysteinresten. (A) Seitenansicht auf vier Occ-Moleküle zweier gegenüberliegender Plasmamembranen, die in *trans*- (vertikale Pfeile) und *cis*- (horizontale Pfeile) interagieren. (B) Blick auf die Zelloberfläche aus dem Zelläußeren auf zwei miteinander in *cis* interagierende Occ-Moleküle. Verbindungslinien zwischen den Resten zeigen Interaktionen an. Durchgezogene Linien, extrazellulär; gestrichelte Linien, intrazellulär; Kreise, Cysteinreste; rot, hypoxiesensitive Cysteine; Transmembrandomäne, TMD.

3.2 Phosphorylierungsabhängige Regulation der Interaktion Occludins mit ZO-1 sowie seiner Homodimerisierung

Bei den folgenden Untersuchungen wurden folgende Substitutionsmutanten hergestellt: Serin zu Alanin, Threonin zu Alanin, Serin zu Glutamat sowie Threonin zu Glutamat. Damit sollte Phosphorylierung an Serin und Threoninresten imitiert (zu Glutamat-Austausch) oder

3. Ergebnisse

unmöglich gemacht (zu Alanin-Austausch) werden. Außerdem sollte die Rolle der CK2-abhängigen Phosphorylierung Occludins für die Funktion der TJs näher analysiert werden. Da ZO-1 ein Hauptadapterprotein zwischen Occludin und dem Aktin-Cytoskelett ist und gezeigt werden konnte, dass CK2 humanes Occludin in einem Cluster der humanen AS Threonin400, Threonin404 und Serin408 phosphoryliert (Dörfel *et al.*, 2009; Raleigh *et al.*, 2011; Dörfel *et al.* 2013), wurde die Interaktion der Mutanten YFP-Occludin^{T400E/T404E/S408E} (TripE), YFP-Occludin^{T400A/T404A/S408A} (TripA) und ^{-S408E} zu ZO-1 untersucht. Ein Vergleich der Occludinsequenz zwischen verschiedenen Spezies zeigte, dass diese AS in einer hochkonservierten Region von Occludin vorliegen (Abb. A1), was zu der Annahme einer regulatorischen Bedeutung dieses Bereiches führte. Da Serin und Threonin bekannte Ziele der CK2 sind, führte der sukzessive Austausch dieser AS gegen Alanin zu einer graduellen Abnahme der Phosphorylierung von Occludin (Dörfel *et al.*, 2013).

FRET-Untersuchungen belegten, dass die phosphomimetische Mutation S408E die Interaktion mit ZO-1 eliminiert (-0,4±0,4, relativer Vergleich gegen das Paar YFP-Occludin^{wt}/ZO-1-CFP). Andererseits unterschied sich die *cis*-Interaktion der TripleE Mutante mit ZO-1 (0,8±0,6) nicht von der *cis*-Interaktion zwischen ZO-1-CFP und YFP-Occludin^{wt} (1±0,6). Diese Resultate wiesen auf einen andersartigen Effekt der Einzelmutante gegenüber der Triplemutante hin (Abb. 3.21). Auch die Kotransfektion von YFP-Occludin^{TripA} mit ZO-1-CFP (1±0,4) führte zu keinem signifikanten Unterschied der FRET-Effizienz im Vergleich mit dem Paar YFP-Occludin^{wt}/ZO-1 CFP.

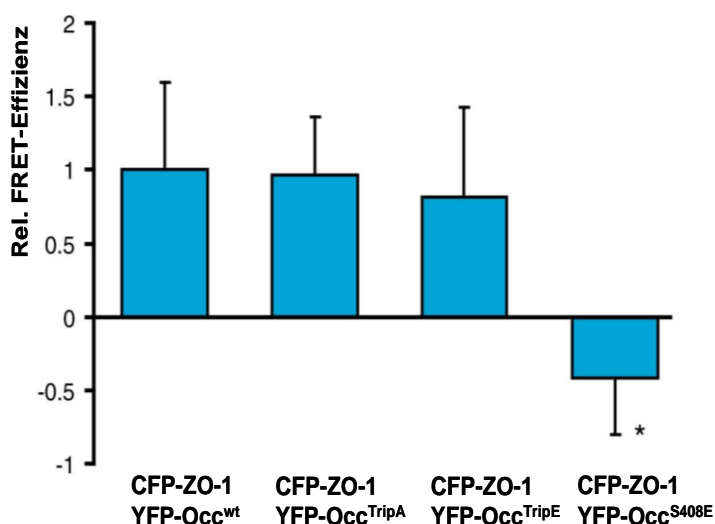


Abb. 3.21: Imitation der Phosphorylierung der Reste Thr400/Thr404/Ser408 in Occludin (Occ) beeinflusste die Bindung zu ZO-1. Die angezeigten YFP-fusionierten Occ-Konstrukte wurden transient in HEK-293-Zellen zusammen mit dem CFP-fusionierten Occ-Wildtyp (wt) transfiziert. Die phosphomimetische Mutante S408E zeigte eine reduzierte Bindung zu ZO-1 innerhalb eines Zell-Zellkontaktes zweier transfizierter Zellen an. Die Tripelmutanten YFP-Occl^{T400E/T404E/S408E} (TripE) und YFP-Occl^{T400A/T404A/S408A} (TripA) blieben ohne Effekt. Relative Mittelwerte±SEM; n≥12; * - p<0,05, verglichen mit der wt/ZO-1 Kontrolle.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass an der Dimerisierung Occludins auch der C-terminale Bereich beteiligt ist (Chen *et al.*, 1997). Da hier auch das bereits erwähnte Phosphorylierungscluster von Occludin (Abb. 1.4) lokalisiert ist, wurde untersucht, ob sich

3. Ergebnisse

die Imitation der Phosphorylierung dieses Bereiches auf die Homooligomerisierung von Occludin auswirkt. Dazu wurden HEK-293-Zellen transient jeweils mit CFP-Occludin^{wt} und einer der oben erwähnten Mutanten transfiziert. Die Mikroskopiebilder in Abbildung 3.22 zeigen deutliche Kolokalisation aller Mutanten mit dem wt an den Zell-Zellkontakten.

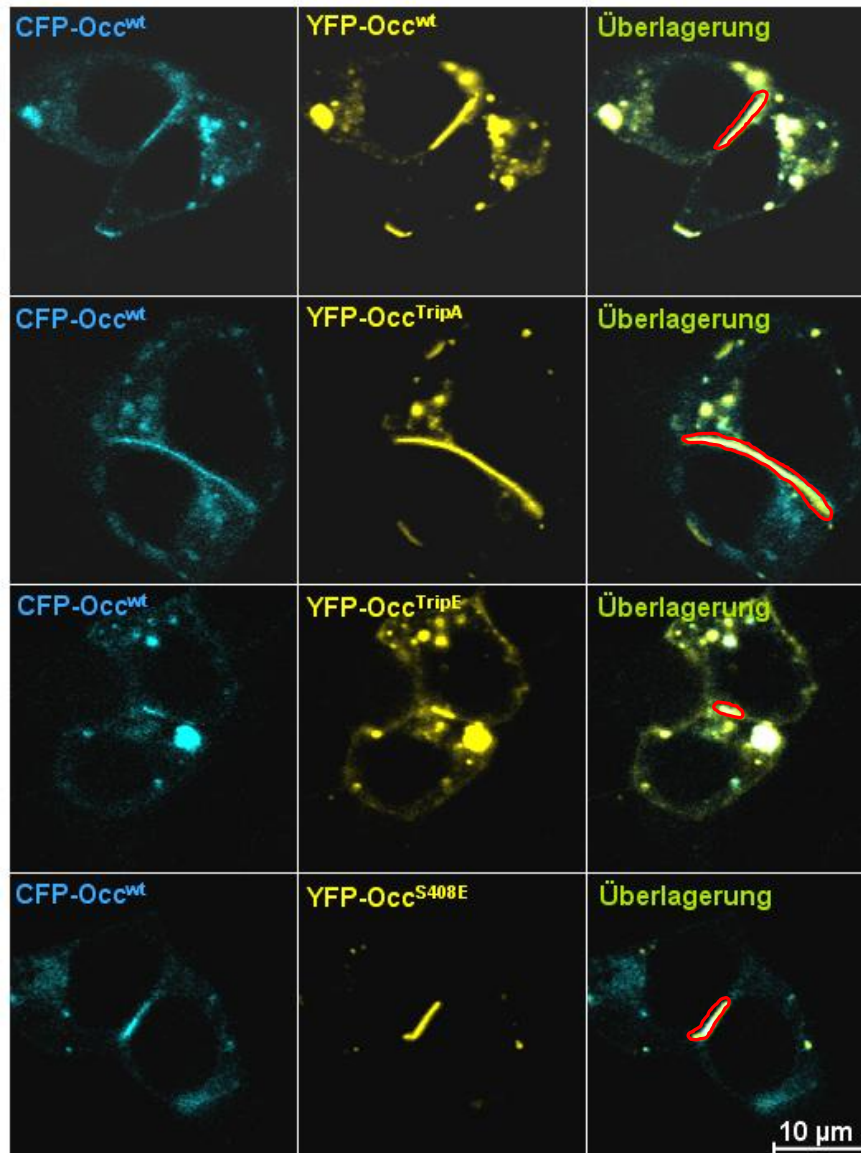


Abb. 3.22: Phosphorylierungsimitation des Restes Ser408 in Occludin (Occ) führte zur Reduktion der Homodimerisation. Transiente Kotransfektionen von CFP (blau)- und YFP (gelb)-fusionierten Occ-Monomeren in HEK-293-Zellen. FRET-Effizienz wurde an Zell-Zellkontakten (rot umrandet) bestimmt. TripE und TripA, Triple E (T400E/T404E/S408E) und Triple A (T400A/T404A/S408A) Mutante.

YFP-Occludin^{TripA} kotransfiziert mit dem CFP-Occludin^{wt} zeigte keine veränderte Interaktion im Vergleich mit der homologen Interaktion zweier Occludin^{wt}-Monomere (wt/wt: $1 \pm 0,07$; TripA/wt: $1,02 \pm 0,09$). Im Gegensatz dazu reduzierten die Mutanten YFP-Occludin^{TripE} ($0,62 \pm 0,07$) und YFP-Occludin^{S408E} ($0,64 \pm 0,06$) die Interaktion mit dem wt signifikant (Abb. 3.23).

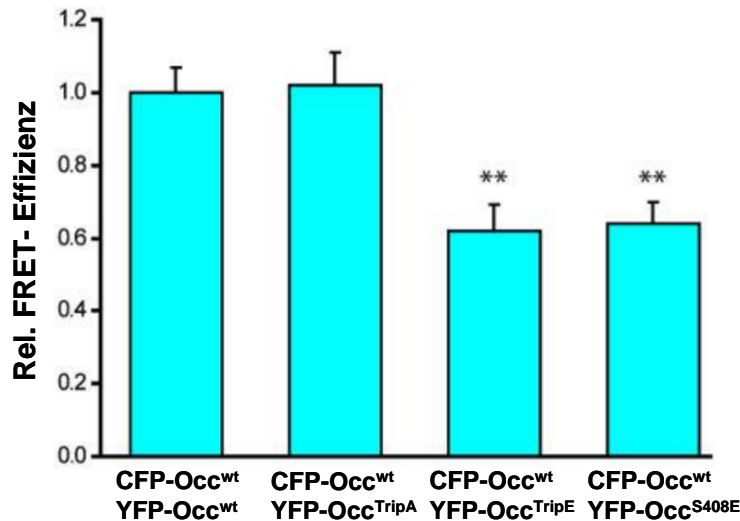


Abb. 3.23: Die Caseinkinase (CK)2-abhängige Phosphorylierung beeinflusste die *cis*-Interaktion von Occludin (Occ) in HEK-293-Zellen. Transiente Kotransfektionen von N-terminal CFP- und YFP-fusionierten Occ-Monomeren. Occ-Wildtyp (wt) war in allen Fällen CFP-, die Mutanten YFP-fusioniert. Die *cis*-Interaktion von Occ wurde mit Hilfe eines FRET-Assays an Zell-Zellkontakten zwischen zwei transfizierten Zellen bestimmt. Sowohl die Einzelsubstitution von Serin durch Glutamat an Position 408 als auch die Dreifachsubstitution gegen Glutamat (T400E/T404E/S408E) reduzierte die FRET-Effizienz im Vergleich zum wt/wt Paar signifikant. Die Dreifachsubstitution gegen Alanin (T400A/T404A/S408A) blieb ohne Effekt. Relative Mittelwerte±SEM; n≥40; ** - p<0,01.

3.3 Tyrosinreste als weitere Determinanten der Dimerisierung und Funktion von Occludin

Die in Kapitel 3.1.9 dargestellte und in der Literatur diskutierte Interaktionsfläche der EZS2 von Occludin (Yaffe *et al.*, 2012; Bellmann *et al.*, 2013) beinhaltet sechs Aromaten. Darunter befinden sich fünf Tyrosine und ein Phenylalanin. Um der Funktion dieser AS auf den Grund zu gehen, wurde mit der Mutante Y220A ein besonders hoch konservierter Aminosäurerest gegen Alanin ausgetauscht.

3.3.1 Membranlokalisations- und Dimerisierungsverhalten der Mutante Y220A

In Abb. 3.24 ist zu sehen, dass sich die Membranlokalisation der YFP-Occludin^{Y220A}-Mutante unter normoxischen Bedingungen nicht von der YFP-Occludin^{wt}-Kontrolle unterscheidet (wt: 1,0±0,2; Y220A: 1,2±0,2; Membran/Cytosol-Rate). Die hypoxietypische Translokation ins Cytosol war bei der Mutante Y220A nicht mehr nachweisbar.

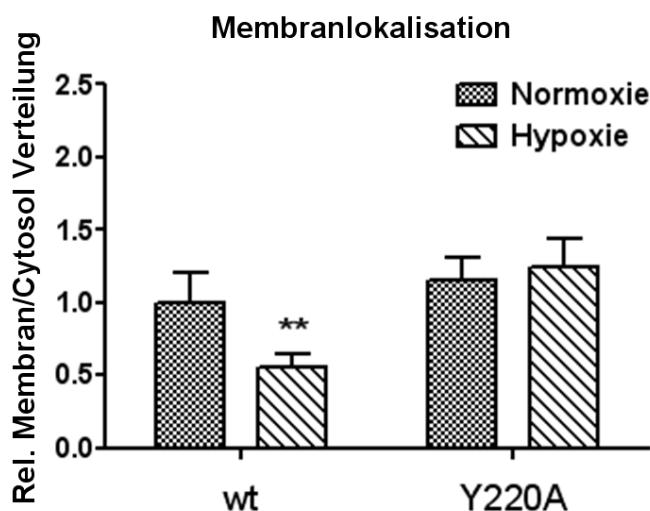


Abb. 3.24: Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte protektive Wirkung für die Membranlokalisation von Occludin gegen Hypoxie. Relative Mittelwerte±SEM; Hypoxiedauer 3 h; n≥40-84; ** - p<0,01; verglichen mit wt unter Normoxie.

Die Abb. 3.25 zeigt, dass die *trans*-Interaktion von der Mutation unter Normoxie im Vergleich zum wt signifikant abgeschwächt wurde ($0,4\pm 0,04$). Der hypoxische Wert der Mutante ($0,7\pm 0,1$; relativ zur normoxischen wt-Kontrolle) ist vergleichbar mit dem Niveau des wt unter Hypoxie ($0,6\pm 0,16$; relativ zur normoxischen Kontrolle). Die typische Reduktion der *trans*-Interaktion nach Inkubation unter Hypoxie fehlte auch hier, vergleichbar mit der Membranlokalisation (Abb. 3.24). Der Wert veränderte sich von Normoxie zu Hypoxie sogar signifikant von $0,4\pm 0,04$ auf $0,7\pm 0,13$ im Vergleich zur normoxischen wt-Kontrolle (Abb. 3.25).

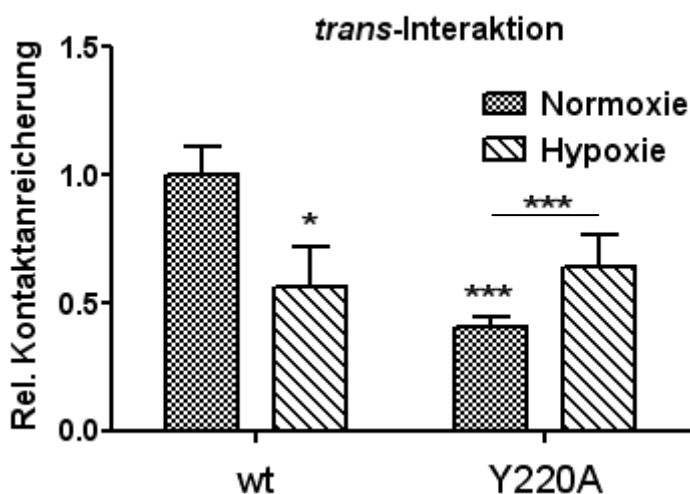


Abb. 3.25: Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte eine protektive Wirkung für die *trans*-Interaktion von Occludin gegen Hypoxie. Relative Mittelwerte±SEM; Hypoxiedauer 3 h; n≥29; * und *** - p<0,05 und p<0,001; verglichen mit wt unter Normoxie oder wie angezeigt.

Während sich YFP-Occludin^{Y220A} von YFP-Occludin^{wt} bezüglich der ausgebildeten *cis*-Interaktion mit Occludin^{wt} unter Normoxie nicht unterschieden, fehlte auch hier die hypoxietypische Verringerung der *cis*-Interaktion (Abb. 3.26). Bezogen auf die normoxische Wildtypkontrolle blieb der Wert hier konstant ($1,5\pm 0,3$ für Normoxie und Hypoxie). Da diese Tendenz auch auf die untersuchten Parameter Membranlokalisation und *trans*-Interaktion

3. Ergebnisse

zutritt, wird eine generelle protektive Wirkung dieser Mutante gegen die Auswirkungen der Hypoxie, wie sie im wt zu finden sind, vermutet.

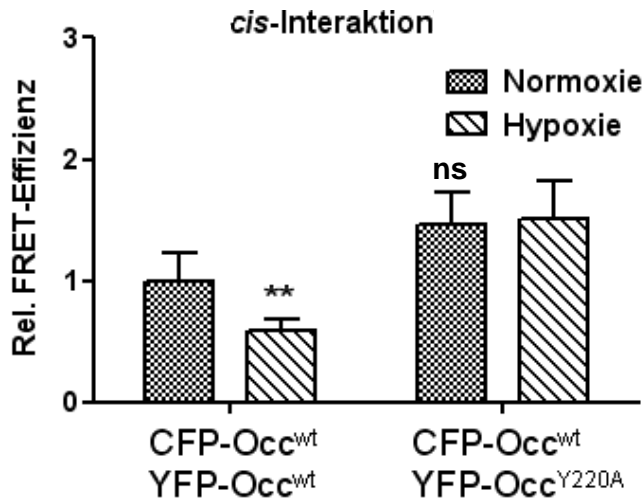


Abb. 3.26: Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte protektive Wirkung auf die cis-Interaktion von Occludin (Occ) gegen Hypoxie. Relative Mittelwerte±SEM; Hypoxiedauer 3 h; n≥29; ** - p<0,01; ns, nicht signifikant, verglichen mit wt unter Normoxie.

Um die Ergebnisse der *cis*-Interaktionsstudie zu untermauern (Bellmann *et al.*, 2013), wurde die Mobilität der Mutante Y220A in der Plasmamembran von HEK-293-Zellen untersucht. Analog zu den Ergebnissen der FRET-Untersuchung zeigte die Mutante im Vergleich zum wt keinen Mobilitätsunterschied (Abb. 3.27).

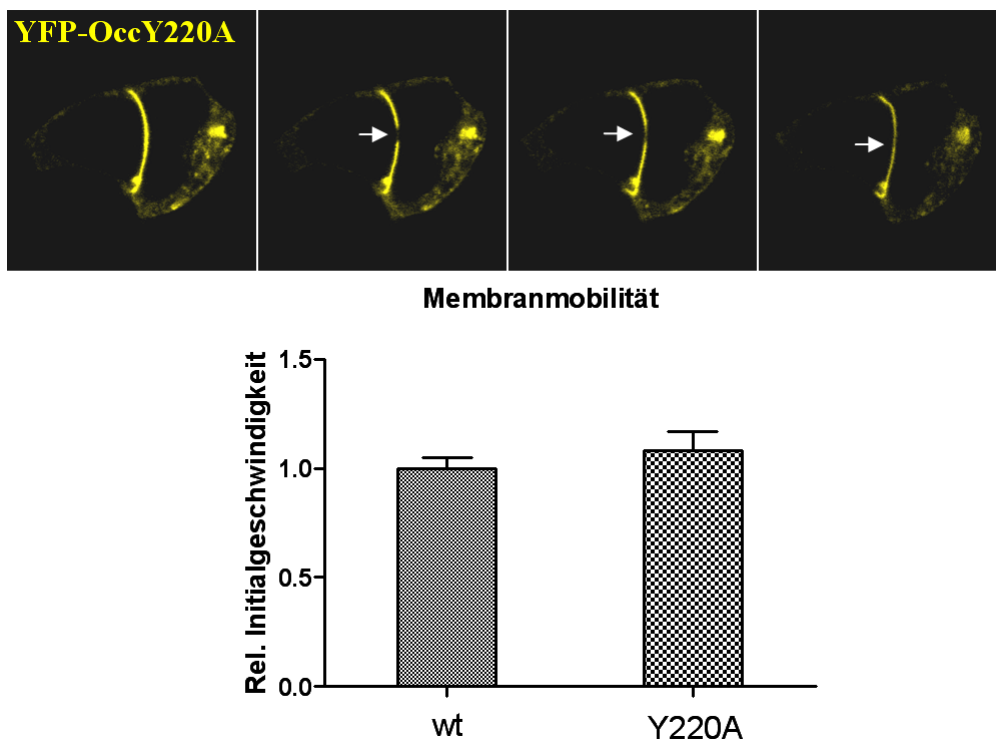


Abb. 3.27: Die Substitution von Tyrosin220 durch Alanin hatte keinen Einfluss auf die Mobilität von Occludin (Occ) in der Plasmamembran. FRAP-Messungen ergaben, dass die Mutante Y220A im Vergleich zum Wildtyp (wt) keine Mobilitätsänderung unter Normoxie aufwies. Relative Mittelwerte±SEM; n≥4.

Bei Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens der Mutante in der SDS-PAGE zeigte sich ein ähnliches Bild wie beim wt (siehe Abb. 3.13): Die Dimer- zu Monomerraten waren nicht unterschiedlich (Y220A: $1,2 \pm 0,3$, verglichen mit dem normierten wt; Abb. 3.28). Nach Hypoxie stieg bei der Mutante Y220A, genau wie beim wt, die Dimermenge im Vergleich zu den Monomeren signifikant an (Y220A: $3,5 \pm 0,6$; wt: $4,8 \pm 0,8$).

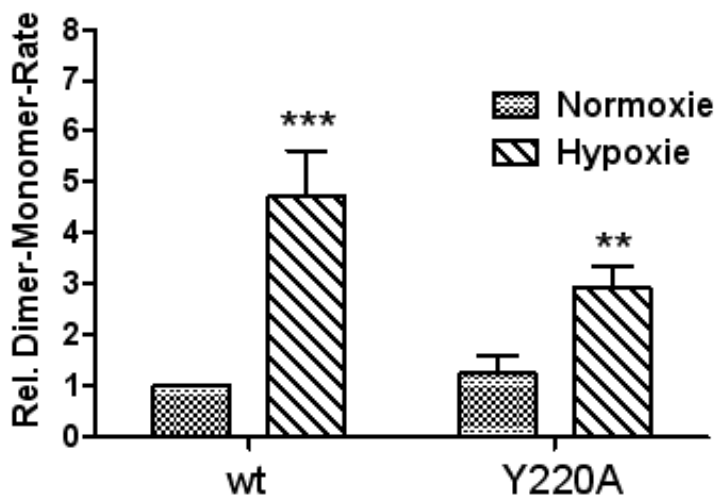


Abb. 3.28: Inkubation von stabil YFP-Y220A transfizierten HEK-293-Zellen unter Hypoxie für 3 h führte zu einer Zunahme des Dimeranteils von Occludin, ähnlich wie für den Wildtyp (wt). Mittelwerte der Dimer-Monomer Rate \pm SEM; $n \geq 6$; *** bzw. ** - $p < 0,001$ bzw. 0,01, verglichen mit wt Normoxie.

3.4 Der Cellmask-Diffusionsassay als Alternative zu Widerstands- und Permeabilitätsmessungen

In der nachfolgenden Untersuchung sollte mit Hilfe des Cellmask-Diffusionsassays (Piontek *et al.*, 2011) gezeigt werden ob, und wie Occludin die Bildung einer Permeabilitätsbarriere beeinflussen kann. Dazu wurden HEK-293-Zellen transient mit YFP-Occludin^{wt} bzw. YFP-Occludin^{C76A} transfiziert und mit 0,4 μ g/ml Cellmask inkubiert. Diese Konzentration entspricht etwa einem fünfzehntel der durchschnittlich empfehlenden Konzentration für die Plasmamembranfärbung von Eukaryoten (Datenblatt Invitrogen). Als Kontrolle wurde Claudin-1-YFP verwendet, welches bekanntermaßen barrierebildend ist. Erst nach 40 bis 60 min begann Cellmask den Kontaktbereich zwischen Claudin-1 transfizierten Zellen zu färben (Abb. 3.29), da Claudin-1 aufgrund seiner abdichtenden Funktion eine Diffusionsbarriere bildet.

3. Ergebnisse

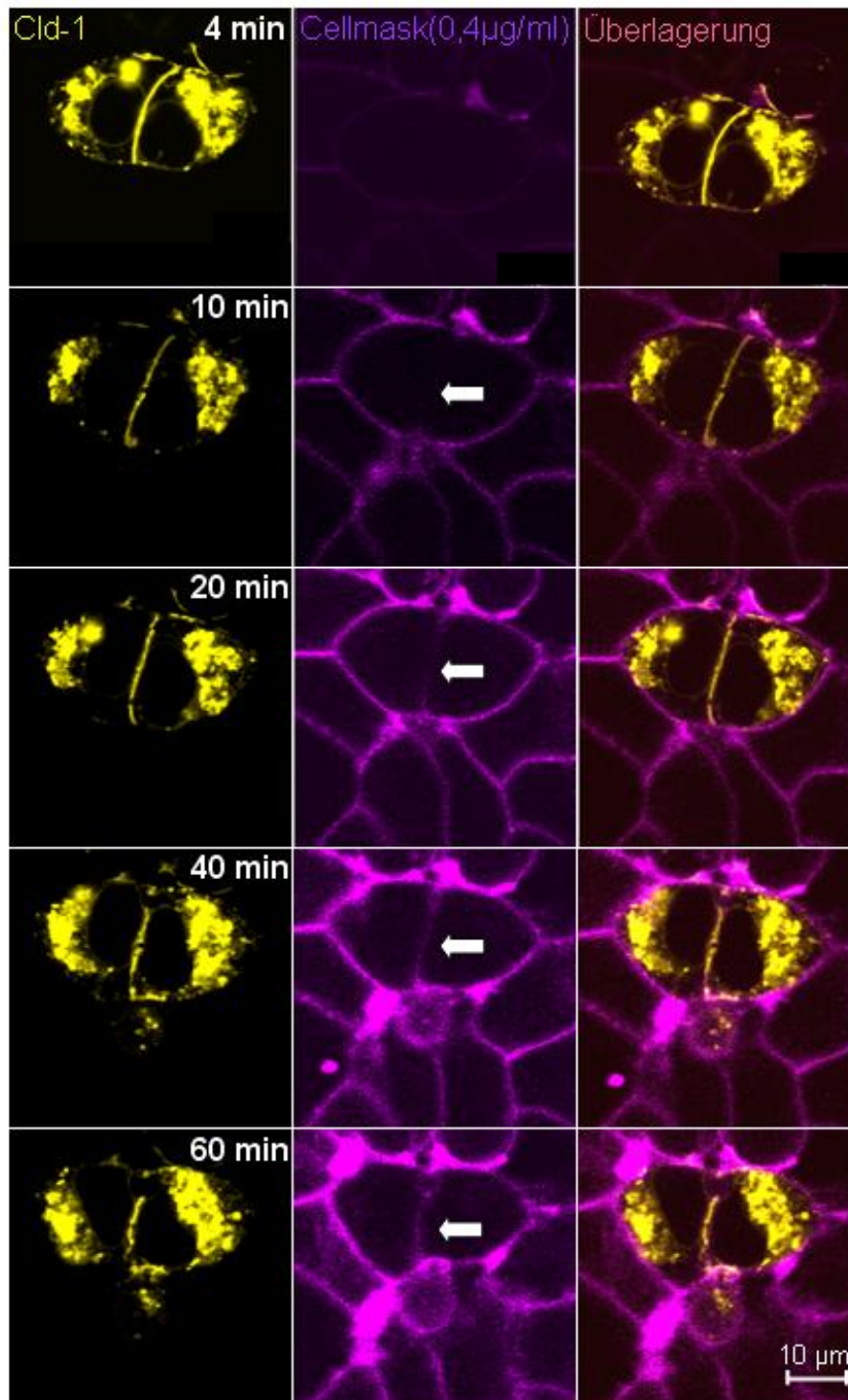


Abb. 3.29: Claudin-1 (Cld-1) bildete eine Cellmask-Diffusionsbarriere an Zell-Zellkontakten zwischen transient transfizierten HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit 0,4 µg/ml Cellmask angefärbt, gewaschen und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht. Die Färbung des Kontaktbereiches zwischen zwei Cld-1 exprimierenden Zellen erfolgte im Vergleich mit der restlichen Plasmamembran deutlich verzögert. Erst nach ca. 1 h war an den mit Cld-1-angereicherten Zellkontakten eine Anfärbung zu detektieren (Pfeile). Gelb, Cld-1-YFP; violett, Cellmask.

Bei den Zell-Zellkontakten mit angereichertem Occludin war die Cellmaskfärbung intensiver als an den Kontaktbereichen ohne Anreicherung. Weiterhin wurden Plasmamembranen mit

3. Ergebnisse

angereichertem Occludin bereits wenige min nach Cellmask-Applikation und somit früher sichtbar als solche ohne angereichertes Occludin (Abb. 3.30).

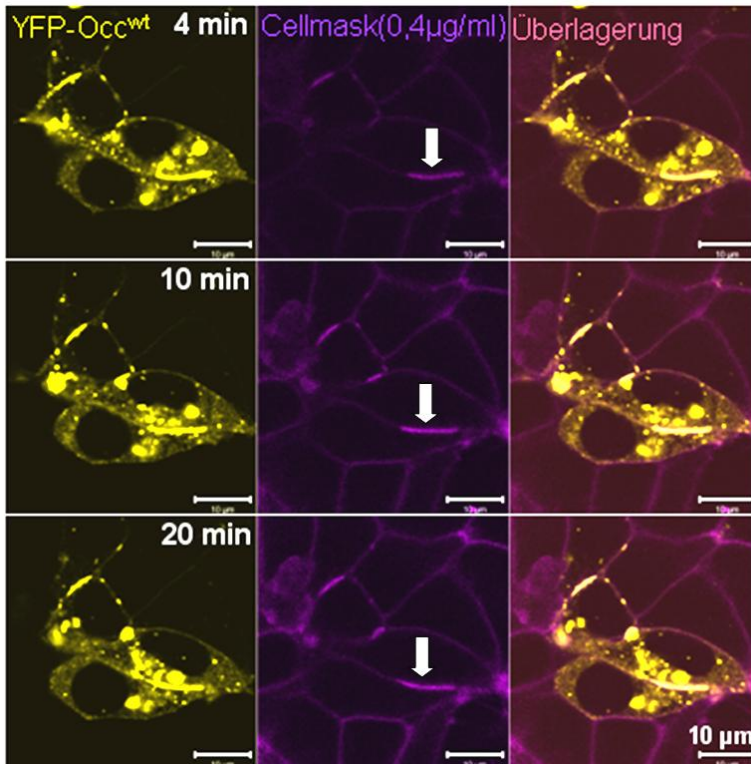


Abb. 3.30: Occludin (Occ) Wildtyp (wt) bildete keine Diffusionsbarriere an Zell-Zellkontakten zwischen transient transfizierten HEK-293-Zellen. Die Färbung des Kontaktbereiches zwischen zwei Occ^{wt} exprimierenden Zellen (Pfeile) erfolgte im Vergleich mit der restlichen Plasmamembran sogar schneller. Gelb, YFP-Occ; violett, Cellmask.

Dieser gegensätzliche Effekt wird durch die im Falle von Claudin-1 deutlich positive ($8,64 \pm 1,17$) und im Falle von Occludin negative ($0,76 \pm 0,04$) Cellmask-Barriererate verdeutlicht (Abb. 3.31). Die Untersuchung der Occludinmutante C76A wies ebenfalls auf keine Etablierung einer Permeabilitätsbarriere durch Occludin hin, obwohl diese Mutante verstärkte Kontakthanreicherung zeigte (Abb. 3.3E), zur Ausbildung erhöhter TEER-Werte beitrug (Abb. 3.17) und zur Verdichtung der Claudin-1 basierten Stränge in transient transfizierten HEK-293-Zellen führte (Abb. 3.18C). Das Erscheinungsbild nach Färbung der Membranen mit Cellmask entsprach bei dieser Mutante dem des Occludin^{wt} (nicht gezeigt).

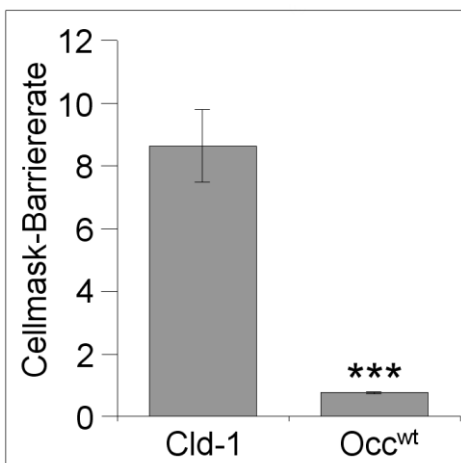


Abb. 3.31: Claudin-1 (Cld-1) bildete eine im Vergleich zu Occludin (Occ) Wildtyp (wt) signifikant schwächere Diffusionsbarriere für den Membranfarbstoff Cellmask aus. Die Cellmask-Barriererate berechnet sich aus dem Quotienten der Cellmask-Signalstärke der Plasmamembran zwischen einer Cld-1- oder Occ-transfizierten Zelle mit einer untransfizierten Zelle und der Cellmask-Signalstärke der Plasmamembranen zweier Cld-1- oder Occ-transfizierten Zellen. Die Messungen erfolgten nach Inkubation von 0,4 µg/ml Cellmask für 20 min. MW ± SEM; n ≥ 6; ***, p < 0,001.

3.5 Untersuchungen cysteinbasierter Interaktionen zwischen Occludin und Claudin-1

Um zu prüfen ob die Annahme eines indirekten, über Claudin-1 vermittelten Effektes von Occludin auf den transzellulären Widerstand valide ist, wurde mittels FRET-Messungen untersucht, ob die Interaktion zwischen Occludin und Claudin-1 möglich ist. Es ergab sich mit $5,6 \pm 2,2\%$ eine mäßige FRET-Effizienz (Abb. 3.32). Diese Bindung war damit schwächer als die Homodimerisierung beider Proteine (Cording *et al.*, 2013; Bellmann *et al.*, 2013). Eine indirekte Wirkung von Occludin auf den transzellulären Widerstand über Claudin-1 ist prinzipiell also möglich. Die Untersuchung der Interaktion zwischen der Occludinmutante C82A (reduzierte die homophile *cis*-Interaktion; Abb. 3.7, 3.15) und Claudin-1 ergab keine signifikante Veränderung, verglichen mit der Interaktion der Wildtypformen beider Proteine. Die FRET-Effizienz lag auch hier bei ca. 6% ($6,27 \pm 1,08\%$; Abb. 3.32).

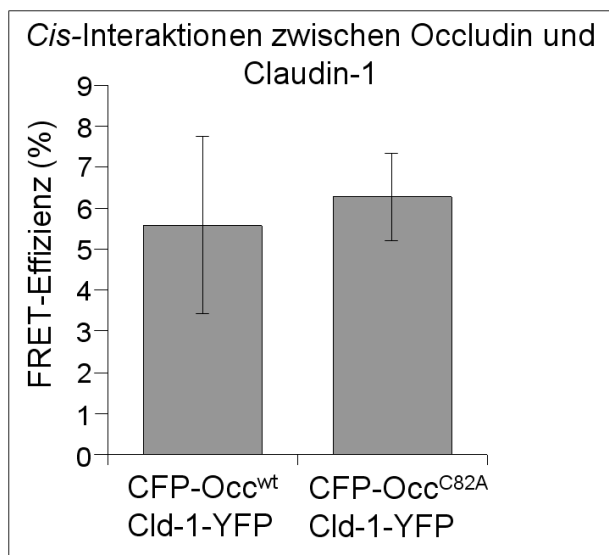


Abb. 3.32: Cystein82 in Occludin (Occ) war nicht an der heterologen Interaktion zwischen Occ und Claudin-1 (Cld-1) beteiligt. Messungen der FRET-Effizienz an transient Cld-1-YFP, mit YFP-Occ-Wildtyp (wt) oder YFP-Occ^{C82A}-kotransfizierten HEK-293-Zellen zeigten, dass Cld-1 mit Occ in *cis*-interagiert. Die Intensität dieser Interaktion lag bei etwa 50% im Vergleich mit der homologen Oligomerisierung von Occ und blieb auch dann stabil, wenn Cld-1 mit YFP-Occ^{C82A} kotransfiziert wurde. Mittelwerte \pm SEM; n \geq 24.

Einen zweiten Hinweis auf die Richtigkeit der Steuerung von Claudin-1 vermittelten Effekten über Occludin lieferte die Untersuchung der Membranlokalisation der Occludinmutante C216A. Diese Mutante wies eine im Vergleich mit dem wt signifikant reduzierte Membranlokalisation (ca. 50%; Abb. 3.33) sowie starke intrazelluläre Aggregatbildung auf (vgl. Kap. 3.1.2, 3.1.3; Abb. 3.3 bis 3.6). Wurde diese Mutante mit Claudin-1 kotransfiziert, so stellte sich die Membranlokalisation der Mutante wieder her ($85 \pm 13\%$, ausgehend vom monotransfizierten wt; Abb. 3.33).

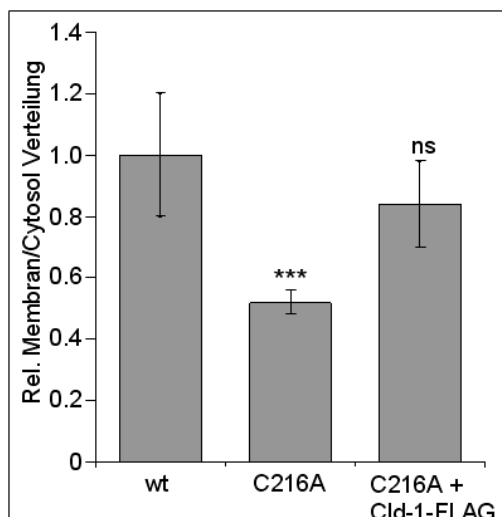


Abb. 3.33: Claudin-1 (Cld-1) rekrutierte Occludin (Occ) C216A zur Plasmamembran. Die Kotransfektion von Cld-1-FLAG mit YFP-Occ^{C216A}, einer Occ-Mutante, deren plasmamembranale Lokalisation gestört ist, führte zu einer Membranlokalisation der Mutante, die vergleichbar mit der des Occ-Wildtyps (wt) war. Mittelwerte±SEM; n≥18; ***, p<0,001; ns, nicht signifikant, verglichen mit der wt-Kontrolle.

3.6 Cysteinbasierte Interaktionen zwischen Occludin und MarvelD3

Nach der Untersuchung von cysteinbasierten Interaktionen zwischen Occludin und Claudin-1 sollten derartige Interaktionen innerhalb der TAMP-Familie analysiert werden. Dazu wurde MarvelD3 mittels FRET auf Interaktion mit Occludin und dessen Cysteinmutanten getestet. Es wurde nachgewiesen, dass Occludin mit MarvelD3 ähnlich stark wie Occludin mit Claudin-1 interagiert (vgl. Kap. 3.5). Die FRET-Effizienz zwischen beiden wt-Proteinen betrug $6,3 \pm 1,6\%$ (Abb. 3.34, Diagramm). Alle getesteten Mutanten verringerten die Bindung in unterschiedlichem Ausmaß. Die stärksten Interaktionen bedingten die Cysteine C76 und C148, da deren Mutationen die geringsten FRET-Effizienzen aufwiesen ($0,2 \pm 0,5\%$ bzw. $0,9 \pm 0,7\%$). Diese Cysteinreste waren für die Homooligomerisierung von Occludin nicht relevant (siehe Kap. 3.1.2). Die Occludinmutante C216A zeigte mit einer FRET-Effizienz von $0,4 \pm 0,7\%$ ebenfalls eine sehr geringe heterologe *cis*-Interaktion (Abb. 3.34, Diagramm). Den geringsten Effekt wies die Mutante C82A auf, welche bei der Untersuchung der homologen Occludininteraktion neben den Cysteinen der EZS2 die stärksten Effekte hatte (Kap. 3.1.2, Abb. 3.7).

3. Ergebnisse

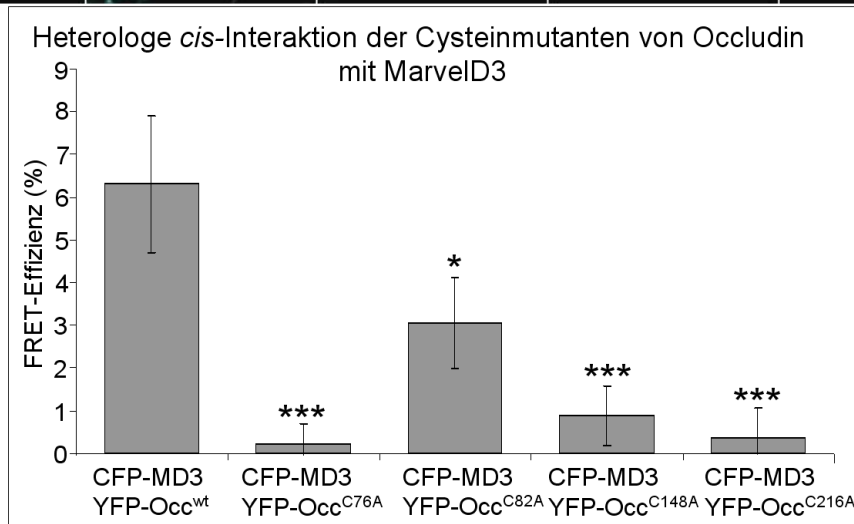
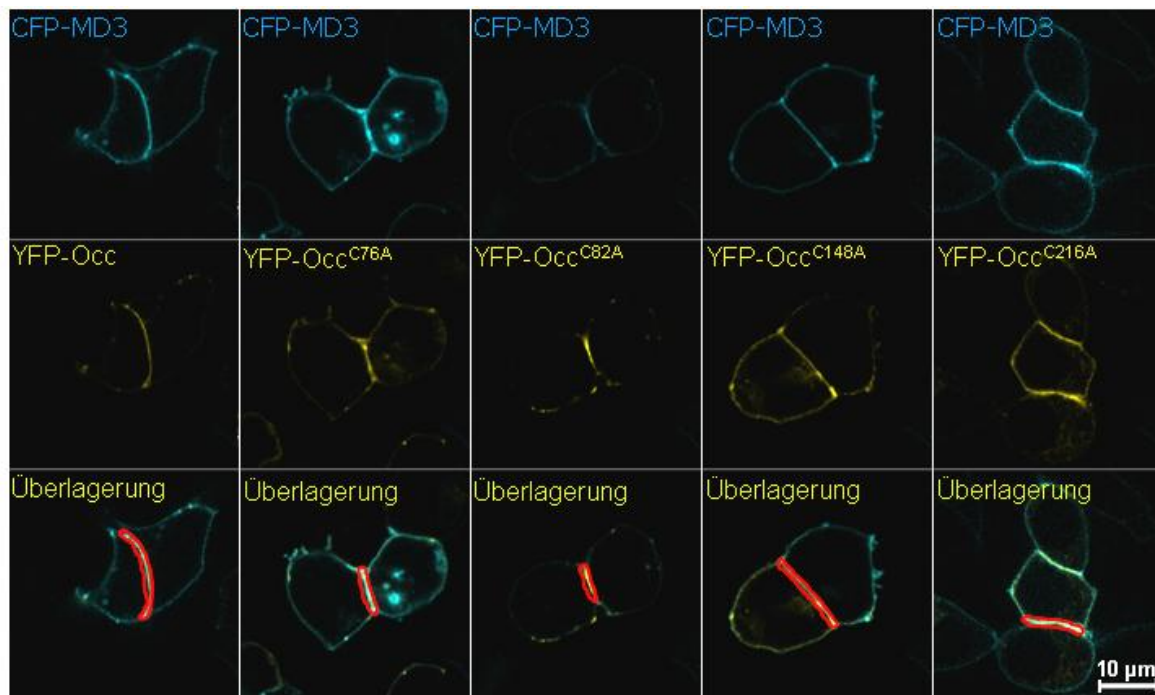


Abb. 3.34: Transiente Transfektion und FRET-Messungen von CFP-fusioniertem MarvelD3 (MD3, blau) und YFP-fusioniertem Occludin (Occ, gelb) in HEK-293-Zellen führte zu Kolokalisation und cysteinabhängiger *cis*-Interaktion der Proteine. Am stärksten wirkten sich die Cystein zu Alanin Mutationen an den Positionen C76, C148 und C216 der humanen Sequenz von Occ auf die heterologe *cis*-Interaktion aus. Rote Bereiche, Messbereich für die FRET Effizienz; Mittelwert±SEM; n≥28; * und ***, p<0,05 und p<0,001.

4. Diskussion

4.1 Redoxsensitivität und deren strukturelle sowie funktionelle Konsequenzen für Occludin und die *tight junction*

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise für Alterationen an TJs durch pathologische Bedingungen wie z.B. Hypoxie (Yamagata *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass das TJ-Protein Occludin reversibel auf hypoxische Bedingungen reagieren kann (Mark und Davis, 2002). Weiterhin verringert sich Occludin in der Plasmamembran von Alveolarepithelzellen infolge von Hypoxie (Caraballo *et al.* 2011). Occludin könnte daher eine regulatorische Rolle für die TJ unter reduzierenden Bedingungen spielen, wie sie mit Hypoxie einhergehen (Blasig *et al.*, 2011). Bislang sind die molekularen Ursachen dieses Effektes jedoch vollständig unklar.

Mit der vorliegenden Arbeit kann erstmalig gezeigt werden, dass die EZS2 von Occludin wichtige Oligomerisierungseigenschaften hat. Cysteinmutationen innerhalb der EZS2 (C216A und C237A) reduzieren die *trans*-Interaktion, die *cis*-Interaktion, die Membranmobilität und die Membranlokalisation von Occludin. Die intrazelluläre Akkumulation, wie sie für die EZS2-Mutanten zu finden ist, wurde auch für einige Mutationen in beiden EZS und TMD von Claudin-16 (Hou *et al.*, 2005) und den *gap junctions*-bildenden Connexinen (Deschenes *et al.*, 1997) beobachtet. Die TMD1 kann, wie vermutet (McCaffrey *et al.*, 2008), ebenfalls bedeutend für die homologe Oligomerisierung von Occludin sein. Die Mutation C82A reduziert Occludins *cis*-Interaktion und erhöht seine Membranmobilität.

Die *cis*-Interaktionen von Occludin und seinen Cysteinmutanten werden in dieser Arbeit durch FRET-Messungen quantifiziert. Diese Methode wurde z.B. zur Untersuchung von Interaktionsbereichen für die homologe Interaktion zwischen Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie angewandt (Chan *et al.*, 2001). Weiterhin erfolgte die erstmalige Erfassung der homologen Interaktion von Occludin^{wt} mittels FRET-Assay (Blasig *et al.*, 2006). In vorhergehenden Studien diente die Strangbildung der Claudine als indirekter Nachweis für *cis*-Interaktionen innerhalb von TJs (Furuse *et al.*, 1999). Dieses Vorgehen liefert jedoch keine Informationen darüber, ob Claudine wirklich direkt miteinander interagieren. Klare Vorteile der FRET-Messung dieser Arbeit gegenüber der Gefrierbruchmethode sind die zumindest indirekte Nachweisbarkeit und die Quantifizierbarkeit der *cis*-Interaktionen von Occludin und seinen Cysteinmutanten.

Untersuchungen der Membranmobilität mittels FRAP können dazu beitragen, veränderte *cis*- und *trans*-Interaktionen von Occludinmutanten weiter zu charakterisieren (Cording *et al.*,

2013). Alle Occludinmutanten, die zu einer reduzierten *cis*-Interaktion mit dem wt führen (C82A, C216A, C237A), sind mobiler in der Plasmamembran. Erklärbar ist dieser Befund dadurch, dass kleinere Moleküle (z.B. Monomere) mobiler als große (Oligomere) sind, da sie freier in der Plasmamembran diffundieren können (Gambin *et al.*, 2006; Naji *et al.*, 2007). Vorarbeiten stellten eine relativ hohe Mobilität zahlreicher TJ-Proteine mittels FRAP dar (Shen *et al.*, 2008) und widerlegten damit die lange angenommene wenig mobile TJ-Organisation. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Claudine die Mobilität der sehr mobilen TAMPs, zu denen auch Occludin gehört, reduzieren können (Cording *et al.*, 2013). Dies weist auf Interaktionen zwischen diesen Proteinen hin. Die FRAP-Technik ermöglicht die Messung der Diffusion zahlreicher YFP-markierter Occludinmoleküle in einer Probe zur gleichen Zeit. Dies ist ein Hauptvorteil gegenüber der *single particle tracking* (SPT)-Methode. Dabei werden einzelne Moleküle per konfokalmikroskopischer Videoaufnahme verfolgt. Um mit dieser Methode statistisch verlässliche Daten über laterale Diffusionsparameter eines Proteins zu erhalten, müssen große Mengen an Einzelpartikeln über ausreichend lange Distanzen verfolgt werden (Qian *et al.*, 1991). Dies ist der Grund dafür, dass mittels FRAP-Messung in wesentlich kürzerer Zeit weitaus mehr statistisch abgesicherte Daten produziert werden können als durch SPT-Messungen.

Die Bestimmung der oben erwähnten *trans*-Interaktionen von Occludin und seinen Cysteinmutanten erfolgt durch Kontaktanreicherungsassays. Diese Methode wurde erstmals zur Identifikation von AS in Claudin-5 verwendet, die an der homologen Assoziation des Proteins zwischen benachbarten Zellen beteiligt sind (Piontek *et al.*, 2008). Diese Untersuchung bestätigt die Beteiligung EZS2-lokalisierter Reste an der Ausbildung der homologen *trans*-Interaktion von TJ-Proteinen, wie sie die vorliegende Arbeit ähnlich auch für Occludin beschreibt. Frühere Studien verweisen auf Untersuchungen von *trans*-Interaktionen mittels Proteinkristallografie. So konnte gezeigt werden, dass die extrazellulären Domänen des membranständigen TJ-Proteins JAM-A durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen dimerisieren (Prota *et al.*, 2003). Hauptvorteil der Untersuchung der Kontaktanreicherung mittels Anreicherungsassay ist die Möglichkeit der Bestimmung von *trans*-Interaktionen auch ohne Kenntnis der Kristallstruktur der Interaktionspartner. Außerdem ermöglicht diese Methode, im Gegensatz zur kristallgestützten Untersuchung, quantitative Vergleiche der Stärke von *trans*-Interaktionen verschiedener Bindungspartner. Weiterer klarer Vorteil des Anreicherungsassays ist die Bestimmung der *trans*-Interaktionen an lebenden Zellen. Gravierende Verfälschungen durch invasiv wirkende Chemikalien, wie sie etwa für Zellfixierungen genutzt werden müssen (Loqman *et al.*, 2010), können

ausgeschlossen werden. Methanol führt z.B. zu Zellschrumpfung (Bacallo *et al.*, 2006). Dies kann in artifiziell auseinandergezogenen Zell-Zellkontakten resultieren, wodurch unscharfe Fluoreszenzsignale entstehen, die die Auswertung der Kontakthanreicherung unmöglich machen. Außerdem können Proteine ihre Lokalisation verändern und Schwankungen des pH-Wertes und der Temperatur führen zu Veränderungen der Gestalt zellulärer Strukturen in fixierten Zellen (Brunk *et al.*, 2011). Neben den angesprochenen Vorteilen des Kontakthanreicherungsassays gegenüber anderen etablierten Methoden, hat dieses Verfahren auch klare Grenzen: Die Messung von sehr stark angereicherten Zell-Zellkontakten, wie z.B. bei der Occludin^{C76A}-Mutante dieser Arbeit, ist sehr schwierig. Durch den starken Fluoreszenzunterschied des Kontaktbereiches zum Nichtkontaktbereich und die Begrenzung der detektierbaren Fluoreszenzintensitätsbandbreite ist die genaue Quantifizierung derart stark fluoreszierender Zell-Zellkontakte nicht immer möglich. Trotzdem ist diese Methode derzeit die einzige Möglichkeit *trans*-Interaktionen zu quantifizieren. FRET-Messungen zur Bestimmung der *trans*-Interaktionen sind in Bezug auf Occludin und Claudine nicht möglich, da beide Termini im Cytosol lokalisiert sind. Die Fluoreszenzmarkierung der untersuchten Proteine an den Termini behindert so den Energietransfer durch zwei Plasmamembranen und die Breite des parazellulären Spaltes.

Eine weitere Möglichkeit der Bindungsmessung sind SDS-PAGE und anschließende Western Blot-Analyse. Diese Methoden wurden zur Untersuchung der Dimerisierung von Claudin-2 und -4 angewendet (VanItallie *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit angewendete Kombination aus SDS-PAGE, Western Blot und Massenspektrometrie führt zum Nachweis von Occludindimeren aller untersuchten Mutanten und dem wt. Dieses Vorgehen ermöglicht die dreifache Kontrolle: Ein Dimer wird durch die Mobilität im elektrischen Feld, den spezifischen Antikörpernachweis und durch Peptidanalyse identifiziert. Für alternativ anwendbare Methoden wie z.B. Größenausschlusschromatographie oder *pull-down assays* muss zumindest ein Interaktionspartner aufgereinigt vorliegen (Erlbruch *et al.*, 2010). Eine Aufreinigung von Occludin in ausreichender Konzentration wurde trotz mehrfachen Optimierungen der Protokolle bisher nicht erreicht, was diese Arten der Analyse für die vorliegende Arbeit ausschließt. Eine weitere Methode, mit der auch Proteininteraktionen der TJs nachgewiesen wurden, ist der *proximity ligation assay*. Dieses Verfahren führte zum Nachweis der Bindung von TACSTD2 an Claudin-1 und -7 (Nakatsukasa *et al.*, 2010). Das TACSTD2-Protein wird schon seit längerer Zeit mit *gelatinous droplike dystrophie*, einer autosomal-rezessiven Form der cornealen Dystrophie, in Verbindung gebracht. Nachteil des *proximity ligation assays* gegenüber dem verwendeten Western Blot, ist die Notwendigkeit

der Kopplung der zu untersuchenden Interaktionspartner mit Antikörpern und Oligonucleotidsequenzen (Söderberg *et al.*, 2006). Da Occludin für andere Untersuchungen dieser Arbeit als YFP-Fusionsprotein vorliegt, bietet sich der Western Blot als Untersuchungsmethode an. Dimerisierung von Occludinmolekülen durch YFP wird durch Western Blot Untersuchung von YFP-allein ausgeschlossen. Außerdem ist bekannt, dass die Ausgangsform von YFP, das GFP, als Monomer kristallisiert. Auch bei sehr hohen Konzentrationen scheint Dimerbildung des Fluoreszenztags also nicht aufzutreten (Tsien *et al.*, 1998). Ein Nachteil der verwendeten Western Blots ist, dass diese Methode zwischen *cis*- und *trans*-Interaktionen nicht unterscheidet. Daher wurden für Bindungsmessungen in der vorliegenden Arbeit vor allem FRET- und Kontaktanreicherungsassays verwendet.

Die Messung der Membranlokalisation Occludins erfolgt in dieser Arbeit ebenfalls fluoreszenzbasiert. Die Bestimmung der Rate aus membranständigem und cytosolischem YFP-Signal ermöglicht eine relative Quantifizierung der Membranamenge von Occludin im Verhältnis der Menge des Proteins im Perinuklearraum. In vorhergehenden Studien erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung oberflächenexponierter Proteine und Peptide vor allem durch Oberflächenbiotinylierung (Gottardi und Caplan, 1992). Diese Methode diente auch zur Quantifizierung der Membranlokalisation von EZS2-Substitutionsmutanten von Claudin-5 (Piontek *et al.*, 2008). Die Arbeit betont die Wichtigkeit der EZS2 von Claudin-5 für die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran, wie es die vorliegende Arbeit für Occludin tut. Die computergestützte Auswertung von Konfokalmikroskopiebildern lebender Zellen hat die Vorteile, sowohl direkter als auch zeitlich effizienter zu sein. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Membranlokalisation der Occludinvarianten wäre die Immunocytochemie. Konfokalmikroskopiebilder von fixierten Zellen können genauso ausgewertet werden, wie Bilder von lebenden Zellen. Jedoch kommt es durch Fixierung zu den oben bereits diskutierten nachteiligen Effekten der Fixierungskemikalien. Aus den genannten Gründen bleibt die digital gestützte Quantifizierung der Membranlokalisation von Occludin und seinen Cysteinmutanten an lebenden Zellen in der vorliegenden Arbeit die bevorzugte Methode.

Die meisten der für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten in TJ-freien HEK-293-Zellen. Dies ermöglicht die direkte Bestimmung der homophilen und heterophilen Interaktionen von Occludin und seinen Cysteinmutanten ohne Interferenzen endogener TJ-Proteine (Blasig *et al.*, 2006). HEK-Zellen werden häufig als Zellkulturmodell zur Analyse der Interaktionen von TJ-Proteinen verwendet. So wurde in diesen Zellen unter Ausschluss von dessen endogener Expression die homologe *trans*-Interaktion von Claudin-16 erstmals

nachgewiesen (Turksen *et al.*, 2001). Kompensatorische Effekte auf zu untersuchende Occludinmutanten durch andere TJ-Proteine werden verhindert. Bezüglich physiologischer Einflüsse der untersuchten Occludinkonstrukte sind MDCK-II-Zellen ein geeigneteres Modell, da sie endogen TJ-Proteine exprimieren und daher generell funktionelle Parameter ausbilden (Wen *et al.*, 2004). Größter Vorteil der Analyse struktureller und funktioneller Einflüsse von Occludinmutationen in diesen beiden Zelllinien sind die identischen Kulturbedingungen. Dies schließt Einflüsse der Kulturbedingungen auf die Struktur und Funktion der TJs aus (Luo *et al.*, 2005). Die Eigenschaften der bearbeiteten Occludinmutanten sind bezüglich ihrer Membranlokalisation sowie *trans*- und *cis*-Interaktionen in MDCK-II-Zellen und HEK-293-Zellen ähnlich. Gleiches gilt für die vermindernde Wirkung reduzierender Bedingungen auf die Membranlokalisation und die Dimerisierung des Occludin^{wt}. Für die Membranlokalisation ist dies vergleichbar mit *in vivo* Ergebnissen anderer Autoren (Rentea *et al.*, 2012). Die große Ähnlichkeit der gemessenen Parameter in diesen grundlegend verschiedenen Zellsystemen spricht für die Relevanz der durch die untersuchten Cystein zu Alanin-Mutationen entstandenen Alterationen. Kompensatorische Effekte anderer, in MDCK-II-Zellen endogen exprimierter TJ-Proteine, scheint es kaum zu geben.

Die beschriebenen Cysteinsubstitutionen verhindern die Ausbildung von Disulfidbrücken durch die jeweiligen Reste. Dieses mutagenesegestützte Verfahren zur lokalen Blockierung von Disulfidbrücken fand auch bei der Untersuchung der strukturellen Grundlagen für die Funktionen der 2-Cystein-Peroxiredoxine als Chaperone und Peroxidasen Anwendung (König *et al.*, 2013). Disulfidbrücken innerhalb EZS wurden bereits in nicht mit TJ-assoziierten Transmembranproteinen, wie z.B. im Transporter für organische Kationen Typ 2 (OCT2) oder in dem Transporter GPR39 nachgewiesen (Pelis *et al.*, 2012; Storjohann *et al.*, 2008). Für Connexine ist bekannt, dass sie intermolekulare Disulfidbrücken zwischen ihren beiden EZS ausbilden (Unger *et al.*, 1999). Für TJ-Proteine werden durch extrazelluläre Cysteine ausgebildete Disulfidbrücken ebenfalls vermutet (Krause *et al.*, 2008; Blasig *et al.*, 2011; Günzel und Yu, 2013). Disulfidbrücken entstehen im oxidierenden Milieu, wie es bei Normoxie im Extrazellularraum gegeben ist (Jiang *et al.*, 2005). Dementsprechend erfolgt ihr Zerfall bei reduzierenden Bedingungen (Wang *et al.*, 2013), wie sie unter Hypoxie oder nach Applikation von reduzierenden Agenzien (z.B. DTT, wie hier angewendet) entstehen. Abhängig davon, ob Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins oder zwischen Proteinen entstehen, verändern sich die Proteinstrukturen oder -interaktionen redoxabhängig, was meist funktionelle Konsequenzen hat: So führt die Eliminierung der intramolekularen Disulfidbrücke Cystein191-Cystein220 in humanem Thrombin, einer Protease der

Blutgerinnungskaskade, zu 100-fach herabgesetzter Affinität gegenüber ihren Peptidsubstraten (Bush-Pelc *et al.*, 2007). Weiterhin führt die DTT-vermittelte Reduktion der löslichen Guanylatcyclase zum Zerfall des Enzyms in seine Untereinheiten (Zheng *et al.*, 2011) und intermolekulare Cysteine sind auch an der Aktivierung der Proteinkinase PKG1 α durch Oxidantien beteiligt (Burgoyne *et al.*, 2007).

Bezüglich der *trans*-Interaktionen von Occludin sind drei Interaktionsmöglichkeiten denkbar (siehe auch Abb. 3.14), wenn davon ausgegangen wird, dass beide Cysteine der EZS2 Disulfidbrücken ausbilden: (i) Eine direkte intermolekulare Interaktion (Cystein216-Cystein216', Cystein237-Cystein237'); (ii) eine indirekte/kreuzweise intermolekulare Interaktion (Cystein216-Cystein237'; Cystein237-Cystein216'); (iii) eine intramolekulare Interaktion der Reste miteinander (Cystein216-Cystein237).

Das Resultat, dass beide Mutationen in gleichem Maße zu einer Absenkung der *trans*- und *cis*-Interaktionen sowie einer verminderten Membranlokalisation führen, lässt eine *trans*-Interaktion der freien Seitenkette von Cystein237 in Occludin^{C216A} mit der freien Seitenkette des Cystein237' eines anderen Occludin^{C216A} unwahrscheinlich erscheinen (Variante i). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass Cystein216 in Occludin^{C237A} auch nicht mit dem freien Cystein216' eines anderen Occludin^{C237A} *trans*-interagiert. Weiterhin *trans*-interagieren Cystein237 und Cystein216 in Kokultur von monotransfizierten HEK-Zellen mit den jeweiligen Mutationen C216A und C237A nicht (Variante ii). Der Ausschluss der o.g. *trans*-Interaktionsmöglichkeiten beider Cysteine der EZS2 führt zur Annahme einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den Sulfhydrylresten der Cysteine216 und -237 (Variante iii). Aus dieser zuletzt genannten Interaktion resultiert eine Struktur innerhalb der EZS2, welche Occludins *trans*- und *cis*-Interaktionen redoxsensitiv beeinflusst.

Die Mutante C237S bestätigt die Annahme einer Intraloopbindung (Variante iii). Ein vergleichbarer Austausch wurde bereits zum Nachweis von Disulfidbrücken im Adenosin-2B-Rezeptor verwendet (Schiedel *et al.*, 2011). Kovalente Cystein-Cystein-Interaktionen werden dadurch verhindert, ohne dabei die physikochemischen Eigenschaften der Seitenketten stark zu verändern. Der oben erwähnte Cystein zu Serin Austausch hat bezüglich der *trans*- und *cis*-Interaktionen des Cysteins237 die gleichen Auswirkungen wie der Austausch gegen Alanin. Trotz ähnlicher physikochemischer Eigenschaften kann Serin das substituierte Cystein nicht vollständig kompensieren, da es nicht in der Lage ist Disulfidbrücken auszubilden. Dies ist ein weiterer Beleg für die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke innerhalb der EZS2. Spezifische Blockierung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen54 und -64

mittels Cystein zu Serin-Substitution fand auch bei der funktionellen Untersuchung von Claudin-2 Anwendung (Li *et al.*, 2013).

Neben der Blockierung der EZS2-lokalisierten Disulfidbrücke durch Substitutionsmutationen der Cysteine gegen Alanin führen reduzierende Bedingungen, wie beispielsweise Hypoxie oder die Inkubation mit DTT zum Zerfall dieser Disulfidbrücke im Wildtypmolekül. Durch die in der Folge offenbar veränderte Tertiärstruktur der EZS2 werden die *trans*- und *cis*-Interaktionen Occludins innerhalb von 3,5 h Hypoxie oder 30 min nach Zugabe von DTT signifikant reduziert.

Interessanterweise führen die hypoxie- oder DTT-bedingten reduzierenden Bedingungen bei den Mutanten der EZS2 (C216A und C237A) nicht zu schwächeren *trans*- und *cis*-Interaktionen. Verminderte Membranlokalisation, wie bei Occludin^{wt} unter reduzierenden Bedingungen im Vergleich mit Normoxie, kann bei diesen Mutanten ebenfalls nicht mehr beobachtet werden. Ergänzend dazu ist bei den Western Blot-Untersuchungen zwischen Occludin^{wt} unter Hypoxie und den EZS2-Mutanten C216A und C237A unter Normoxie kein Unterschied bezüglich der Dimerisierung nachzuweisen. Für alle drei Konstrukte ist eine ca. fünffach verstärkte Dimerbande im Vergleich zum wt unter Normoxie detektierbar. Beide Bedingungen, sowohl Hypoxie als auch der Austausch der beiden EZS2-lokalisierten Cysteine, führen zur Zerstörung der Bindungsstruktur der EZS2. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme einer Disulfidbrücke zwischen beiden Resten, da der Austausch von Cystein gegen Alanin die Ausbildung einer Disulfidbrücke bereits unter normoxischen Bedingungen unmöglich macht. Eine Reaktion auf Hypoxie ist dementsprechend dann auch nicht mehr möglich. Damit wird unterstrichen, dass die EZS2-Cysteine für die geschwächte Oligomerisierung Occludins unter reduzierenden Bedingungen verantwortlich sind. Dies verdeutlicht die Bedeutung dieser Aminosäurereste auf die Hypoxiesensitivität der EZS2. Intramolekulare Disulfidbrücken, die Membranlokalisation und Oligomerisierung bestimmen, sind in der Literatur z.B. für den organischen Kationentransporter Typ 2 beschrieben (Brast *et al.*, 2012).

Bei der beschriebenen erhöhten Dimerisierungsrate Occludins im Western Blot handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine artifizielle Erscheinung infolge einer verbesserten Bindung der ungeordneten und breiter exponierten EZS2. Diese Bindung wird weiterhin durch die verstärkte Erreichbarkeit der Moleküle füreinander innerhalb der für die Western Blots verwendeten Zelllysate verstärkt. Yaffe *et al.* fanden 2012 ebenfalls durch Veränderungen in der EZS2-Bindungsstruktur (T zu A-Substitutionsmutationen) von Occludin verstärkte Aggregatbildung nach Transfektion in COS7-Zellen. Diese Strukturen

können in Western Blots zur Zunahme höhermolekularer Banden führen. Der Zusammenhang zwischen verstärkter Aggregation und höherer Oligomerisierung ist für das synaptische Protein α -Synuclein bei Interaktion mit dem CL-1 Peptid nachgewiesen. Die Aggregation zu sogenannten *Lewy bodies* wird mit der Entstehung von Morbus Parkinson in Verbindung gebracht und spiegelt sich im Western Blot wieder (Wan *et al.*, 2012). Weitere mögliche Ursache für die vermehrte Dimerbildung des wt unter Hypoxie und der EZS2-Mutanten unter Normoxie wäre eine stärkere *cis*-Dimerbildung, basierend auf der veränderten Struktur der EZS2. Die abweichenden Ergebnisse der Western Blots im Vergleich mit den FRET-Messungen wären vielleicht durch eine veränderte Orientierung der Fluorophore und eine damit verbundenen verschlechterte FRET-Effizienz erklärbar (Raina *et al.*, 2012). Sowohl die Position der *tags* im jeweiligen Molekül (N- oder C-terminal) als auch deren räumliche Lage zueinander beeinflussen FRET-Werte, da die FRET-Effizienz mit zunehmender Entfernung der *tags* zueinander abnimmt (Berney und Danusa, 2003).

Auf Basis der Ergebnisse bezüglich der EZS2 und ihrer Rolle bei der Oligomerisierung von Occludin zwischen und innerhalb von Zellmembranen unter Normoxie und Hypoxie wird erstmalig ein molekulares Modell für diesen Bereich abgeleitet. Dabei findet die beschriebene, unter Normoxie bestehende, abgeschirmt im Inneren der EZS2-lokalisierte Disulfidbrücke und eine daraus resultierende nach außen orientierte Schleifenstruktur Berücksichtigung. Weiterhin werden zwei als auswärts gerichtet beschriebene Tyrosine des C-terminalen Teils der EZS2 in das Modell einbezogen (Yaffe *et al.*, 2012). Das daraus resultierende dreidimensionale Modell der Sekundär- und Tertiärstruktur der EZS2 von Occludin ist in Abb. 3.19 dargestellt. Die Modellierung führt zu einer komplexen Struktur, in der eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 216 und -237 eine Loopstruktur innerhalb der EZS2 bildet. Diese Struktur zeigt zwei antiparallele β -Stränge und eine N-terminale α -Helix. Für eine Beteiligung dieser Sekundärstrukturen am Aufbau der EZS2 gibt es Hinweise aus der Literatur (Nusrat *et al.*, 2005). Die β -Stränge sind mit der α -Helix über die erwähnten Cysteine fest verbunden und bilden eine kompakte Struktur, in der die α -Helix die β -Stränge stabilisiert. Der C-terminale β -Strang exponiert zwei Tyrosine, die als Oligomerisierungsort von Occludin postuliert werden (Yaffe *et al.*, 2012).

Die vorliegende Arbeit beleuchtet erstmals die molekularen Ursachen der hypoxieabhängigen Oligomerisierung Occludins. Darüber hinaus weisen die durchgeführten Experimente nach, dass sich reduzierende Bedingungen direkt auf das membranständige Occludin auswirken und nicht als Ursache eines gestörten Einbaus von Occludin infolge von Faltungsproblemen in Frage kommen: Die Blockierung des zellmembrangerichteten Occludintransports durch

BrefeldinA (Klausner *et al.*, 1992) oder Cycloheximid (Dukes *et al.*, 2012) kann die Menge des membranständigen Occludins nach 1,5 bzw. 16 h nicht deutlich verringern. Occludin ist also nicht maßgeblich von einer ständigen Zufuhr von Proteinen abhängig, um in der Plasmamembran lokalisiert zu bleiben. Die DTT-vermittelte Reduktion bei gleichzeitiger Hemmung des Transfers zur Zellmembran ergibt eine klare Verringerung des membranständigen Occludinsignals innerhalb von min. Dieser Effekt macht deutlich, dass membranständiges Occludin direkt auf reduzierende Bedingungen reagiert, was seine angenommene Funktion als Redoxsensor (Blasig *et al.*, 2011) unterstreicht. Auch andere Autoren identifizierten Disulfidbrücken als redoxensitive Modulatoren von verschiedensten Proteinfunktionen (Nagahara, 2011).

Die durch die vorliegende Studie aufgedeckte direkte Hypoxieantwort von Occludin ist ein neuer und spezifischer Mechanismus der redoxabhängigen Dynamik der TJ, da es sich bei Occludin um einen allgemeinen TJ-Marker handelt (Blasig *et al.*, 2011). Eine spezifische Rolle von Occludin unter Hypoxiebedingungen wird durch die Ergebnisse von Caraballo und Mitarbeitern (2011) unterstützt. In dieser Arbeit reagierte Occludin von den untersuchten TJ-Proteinen am ehesten und am stärksten sensitiv auf Hypoxie.

4.2 Die Rolle membranständiger Cysteine bei der Homooligomerisierung von Occludin

Im Gegensatz zu den Cysteinen der EZS2 ist das Cystein82 der humanen Occludinsequenz (TMD1) nicht hypoxiesensitiv. Der Austausch dieses Cysteins durch Alanin führt zu einer deutlich verringerten *cis*-Interaktion mit Occludin, die von einer deutlichen Erhöhung der Membranmobilität dieser Mutante begleitet ist. Die verringerte *cis*-Interaktion der C82A-Mutante mit dem wt ist unter Hypoxie verstärkt. Dies spricht gegen Redoxsensitivität dieses Restes. Kofransfektion der C82A-Mutante als CFP- und YFP-Fusionsprotein unter Normoxie schwächt die *cis*-Interaktion im Vergleich zur *cis*-Interaktion zwischen C82A-Mutante und wt zusätzlich ab. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz gegen die Annahme einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen82 zweier Occludinmonomere. Bei Annahme einer solchen Disulfidbrücke wäre gleichgültig, ob nur ein oder beide Bindungspartner blockiert werden. Das Ergebnis wäre in beiden Fällen der Verlust der Bindung (Günzel und Yu, 2013). Der Austausch des Cysteins82 gegen Serin, welches vergleichbare physikochemische Eigenschaften wie Cystein aufweist, aber nicht in der Lage ist Disulfidbrücken auszubilden, führt nicht zur Abschwächung der *cis*-Interaktion der Mutante mit dem wt. Dieses Ergebnis belegt, dass eine Disulfidbrücke nicht die Grundlage der Cystein82-basierten *cis*-Interaktion

von Occludin ist. Durch Cystein zu Serin-Substitution konnte mittels 7-methyl-GTP(m7GTP)-Affinitäts-Säulenchromatographie die Beteiligung des Cysteins⁸⁵ des eukaryotischen Initiierungsfaktors eIF-4E von *Xenopus laevis* an einer intramolekularen Disulfidgruppe ausgeschlossen werden (Wakiyama *et al.*, 1997). Die Cysteinunabhängigkeit der homophilen Assoziation zweier TMD1 von Occludin wird dadurch unterstützt, dass der Redoxzustand im lipophilen Milieu der Plasmamembran nicht definiert ist. Cystein⁸² scheint deshalb eher über polare Wechselwirkungen an der Assoziation der TMD aneinander beteiligt zu sein. Polare Reste von Cystein, Serin und Threonin können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen TMD eingehen (Gaddie *et al.*, 2009). Das Alignment von Occludin (Abb. A1) weist auf eine hohe Konservierung der AS Serin⁸⁵ und Threonin⁸⁶ hin. Diese Reste befinden sich in der gleichen Transmembranhelix wie und in enger Nachbarschaft zu Cystein⁸² und stehen so zur Bildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung. Auf eine eventuelle Interaktion zwischen zwei TMD1 von Occludin weist auch ein für Rattenoccludin konstruiertes Hydrophobizitätsdiagramm hin (McCaffrey *et al.*, 2008). Die auf dieser Basis von uns (Bellmann *et al.*, 2013) und Yaffe *et al.* (2012) ausgewählte Orientierung zweier TMD1 und zweier TMD4 zueinander berücksichtigt weiterhin, dass die EZS2 eine Rolle bei der *cis*-Oligomerisierung spielt. Dies wird dadurch gestützt, dass aromatische AS des C-terminalen Endes der EZS2 an der *cis*-Oligomerisierung beteiligt sein könnten (Yaffe *et al.*, 2012). Letztgenannte Arbeit schlägt ein 4TMD-Bündel für die Orientierung der TMD zueinander vor. Die Kombination dieser Hypothesen und der experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Studie führten erstmals zu der Annahme, dass die TMD4 und die TMD1 zweier Occludinmoleküle sich gegenüber liegen müssen (Abb. 3.20 B). Der Nachweis des Einflusses der EZS2 von Occludin auf die *cis*- und *trans*-Interaktion, führt weiterhin zur Hypothese, dass Occludin *in-vivo* als Tetramer vorliegen könnte (Abb. 3.20A). Allerdings war es bisher nur möglich Dimere zweifelsfrei nachzuweisen. Wahrscheinlich beruhen höhere Organisationsstufen auf van der Waalsschen Wechselwirkungen und sind somit zu instabil für einen Nachweis durch Western Blots. Diese unterschiedliche Empfindsamkeit verschiedener Organisationsstufen von Occludin könnte eine weitere Rolle für die Signalfunktion dieses Proteins spielen.

Unerwarteterweise *trans*-interagieren die Mutante C76A (TMD1) und die Mutante C148A (TMD2) an den Kontaktbereichen zweier transfizierter Zellen jeweils deutlich stärker mit sich selbst als dies der wt tut. Die Daten sprechen dafür, dass diese Cysteine in der Lage sind, die *trans*-Interaktionen von Occludin indirekt zu beeinflussen. Für die Cysteine⁷⁶ und ⁻¹⁴⁸ existieren keine entsprechenden, zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen benötigten,

polaren Gegenreste in allen TMD. Die Sequenzanalyse ergibt nur hochkonservierte, unpolare Reste im näheren Umfeld dieser Cysteine (Bellmann *et al.*, 2013). Wie mittels des N-terminalen Teils des Lamdarepressors gezeigt wurde, können sich unpolare AS destabilisierend auswirken (Parsel *et al.*, 1990). Daher wird angenommen, dass diese Cysteine am Erhalt des Abstandes der TMD1 und 2 beteiligt sind und dabei die *trans*-Bindungseigenschaften von Occludin, evtl. über Veränderungen in der Struktur der EZS1, indirekt regulieren.

Zusammenfassend wurde eine intramolekulare Interaktion der Cysteine216 und -237 innerhalb der EZS2 von Occludin unter Normoxie identifiziert. Die durch diese Disulfidbrücke entstehende Struktur ermöglicht indirekt zwei Interaktionsarten: Die *trans*-Interaktion zu einer EZS2 eines gegenüberliegenden Occludinmoleküls und die *cis*-Interaktion zu einer benachbarten EZS2 innerhalb einer Plasmamembran. Weiterhin werden die Membranlokalisation und -mobilität durch die Ausbildung dieser Tertiärstruktur verstärkt bzw reduziert. Basierend auf den Daten bezüglich der strukturellen Organisation der EZS2 kann erstmalig ein molekulares Modell dieses Bereiches konstruiert werden, das auch die Ergebnisse der Vorarbeiten anderer Autoren (McCaffrey *et al.*, 2008; Yaffe *et al.*, 2012) berücksichtigt. Außerdem ermöglicht ein Cystein innerhalb der TMD1 die *cis*-Interaktion zu einer weiteren TMD1' eines sich in derselben Plasmamembran befindenden Occludinmoleküls, bildet jedoch keine Disulfidbrücke aus. Die hohe Konservierung zweier Cysteine einer EZS aller Membranproteine der TJs (Krause *et al.*, 2008; Blasig *et al.*, 2011) und die heterologe Oligomerisierung dieser Proteine (Cording *et al.*, 2013) eröffnet die Möglichkeit der Generalisierung der EZS2-Struktur von Occludin zum Modell. In der EZS1 von Claudin-1 wurde kürzlich eine ähnliche, auf der Interaktion zweier hochkonservierter Cysteine basierende Struktur wie bei Occludin in der EZS2 nachgewiesen (Dabrowski *et al.*, eingereicht bei ARS). Weiterführend könnten *microscale*-thermophoresegestützte, unabhängige Bindungsmessungen zwischen den EZS2 von TAMPs und den EZS1 von Claudinen zum besseren Verständnis der Relevanz und Funktionsweise dieser Schleifenstruktur auf heterologer Ebene beitragen.

4.3 *Tight junction* - Physiologischer Einfluss der Cysteinaustauschmutanten von Occludin

Die funktionelle Betrachtung von Occludin erfolgt in der vorliegenden Arbeit in engem Zusammenhang mit Claudin-1. Claudin-1 ist ein in vielen Zellbarrieren exprimiertes Mitglied

der Claudinfamilie und gehört zu den klassischen sowie abdichtenden Claudinen (Krause *et al.*, 2008).

Auf einen Einfluss von Occludin auf die Barrierebildung deuten die Untersuchungen der TEER-Werte in MDCK-II-*knockdown*-Zellen hin. Diese weisen, im Einklang mit anderen Autoren (Yu *et al.*, 2005), einen im Vergleich zu normalen MDCK-II-Zellen um ca. 50% reduzierten maximalen TEER-Wert auf. TEER-Messungen werden verwendet, um die Auswirkungen molekularer Veränderungen in den TJs zu untersuchen: Die Herunterregulation von Occludin nach Raf-1-Transfektion führt z.B. zu reduzierten TEER-Werten (Li *et al.*, 2000), während die Expression von Claudin-19 in MDCK-II-Zellen zu erhöhten TEER-Werten führt (Angelow *et al.*, 2007). TEER-Messungen erlauben, wie auch Permeabilitätsmessungen mit fluoreszierenden Molekülen, die Bestimmung der transzellulären Dichte (Dohgu *et al.*, 2011). Es lassen sich Aussagen über Barriereveränderungen treffen, die auf veränderten Leitfähigkeiten von Ionen beruhen. Da Puffersysteme, in denen die Zellen kultiviert werden jedoch immer kleinste Ionen, wie z.B. Calcium beinhalten, ist es im Gegensatz zu Permeabilitätsmessungen nicht möglich, selektiv veränderte Dichteigenschaften von Zellmonolayern für größere Moleküle zu bestimmen. Vorteil der TEER-Messungen gegenüber den Permeabilitätsmessungen ist, dass es eine direkte Messmethode ist. Die Intensitätsbestimmung der Permeation auf Basis spektraler Eigenschaften ist, anders als bei Permeabilitätsmessungen, nicht nötig. Beide Messmethoden sind jedoch stark Temperaturabhängig (Blume *et al.*, 2010). Physiologisch relevante Temperaturerhöhung von 37 auf 41°C führt zu reduzierter Dichte von Caco-2-Zellmonolayern, die mit verstärkter Expression und TJ-Lokalisation von Occludin einhergeht (Dokladny *et al.*, 2006). Da hohe TEER-Werte positiv mit der relativen Anzahl der TJ-Stränge verbunden sind (Claude *et al.*, 1978), eignet sich die Gefrierbruchelektronenmikroskopie gut als unterstützende Untersuchungsmethode. Korrelationen zwischen gefrierbruchelektronenmikroskopischen- und TEER-Untersuchungen zur Analyse des TJ-Aufbaus in MDCK-II-Zellen sind literaturbekannt (Griep *et al.*, 1983).

Die Untersuchung Occludins mit diesen beiden Methoden gibt Hinweise auf eine eher indirekte Einwirkung von Occludin auf den transzellulären Widerstand. So beweisen gefrierbruchelektronenmikroskopische Untersuchungen in TJ-freien HEK-293-Zellen, dass Occludin allein keine membranständigen TJ-Stränge ausbildet (eigene Arbeiten in Kooperation mit der AG Fromm, Charité Berlin, Campus Benjamin-Franklin). Transfiziertes Claudin-1 hingegen bildet in allen untersuchten Proben derartige Stränge. Nicht unerwähnt sollte in diesem Zusammenhang bleiben, dass es in der Literatur Hinweise auf die Bildung

rudimentärer TJ-Stränge durch Monotransfektion von Occludin in TJ-lose L-Fibroblasten gibt (Furuse *et al.*, 1998). Einen Hinweis auf das regulatorische Wirken von Occludin liefert weiterhin die gefrierbruchelektronenmikroskopische Untersuchung der Claudin-1-Stränge in HEK-293-Zellen nach Kotransfektion mit Occludin. Occludin^{wt} erhöht tendenziell die Strangdichte und reduziert damit die Maschenweite (Cording *et al.*, 2013), während es als C76A-Mutante eine signifikante Reduktion der Maschenweite und Erhöhung der Dichte des Claudin-1-Strangnetzwerkes bewirkt. Die Kotransfektionen Claudin-1/Occludin^{C82A} und Claudin-1/Occludin^{C216A} bedingen im Vergleich mit Claudin-1/Occludin^{wt} kein verändertes Claudin-1-Strangnetzwerk.

Arbeiten anderer zum Einfluss von Occludin auf die TJs ergeben einen positiven Effekt von Occludin auf die Dichtigkeit von Epithelzellen (McCarthy *et al.*, 1996; Wong und Gumbiener 1997; Yu *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse und die beobachtete Verdichtung der Claudin-1-Stränge durch die Occludinmutante C76A in HEK-293-Zellen unterstützen unseren Befund, dass stabil FLAG-Occludin^{C76A}-transfizierte MDCK-II-Zellen im Vergleich zu stabil FLAG-Occludin^{wt}-transfizierten Zellen einen deutlich erhöhten transzellulären Widerstand ausbilden. Die verwendeten MDCK-II-Zellen exprimieren endogen Claudin-1 und andere TJ-Proteine (Rahner *et al.*, 2001), was eine regulatorische Funktion von Occludin auf Claudin-1 ermöglicht. Die verstärkte Abdichtung wird indirekt durch Occludin bedingt, da es nach eigenen Untersuchungen allein zur Strangbildung nicht in der Lage ist. Aus den oben genannten Beobachtungen kann abgeleitet werden, dass Occludin und Claudin-1 direkt oder indirekt miteinander interagieren, wobei beide Proteine einen wechselseitigen Einfluss aufeinander ausüben: Durch die starke Anreicherung von Occludin^{C76A} ergeben sich durch Interaktion mit Claudin-1 verdichtete Claudin-1-Stränge. Die geschwächte Membranlokalisation der Occludin^{C216A}-Mutante in HEK-293-Zellen kann jedoch durch Kotransfektion mit Claudin-1 ausgeglichen werden. Dies erklärt den fehlenden Phänotyp der FLAG-Occludin^{C216A}/Claudin-1-Kotransfektion in der gefrierbruchelektronenmikroskopischen Untersuchung von HEK-293-Zellen. Regulatorische Wechselbeziehungen zwischen Occludin und Claudin-1 werden vermutet, da Occludin sich verstärkend auf die homophile *trans*-Interaktion von sowohl Claudin-1 als auch Claudin-5 auswirkt und Kotransfektion von Claudin-1 mit Occludin die mobile Fraktion von Occludin herabsetzt (Cording *et al.*, 2013). Wie für Claudin-1 gezeigt, könnten durch den Einfluss von Occludin verdichtete endogene Claudinstränge die starke Zunahme des TEER-Wertes nach Transfektion mit der Occludin^{C76A}-Mutante in MDCK-II-Zellen verursachen. Entsprechend beschreiben andere Autoren Auswirkungen der Morphologie von TJ-Strängen auf die Barrierefunktion:

Kontinuität und P-face-Assoziation der TJ-stränge korrelieren positiv mit der Barriereintegrität (Wolburg *et al.*, 1994; Liebner *et al.*, 2000).

Die nähere Untersuchung der Interaktion zwischen Claudin-1 und Occludin mittels FRET-Technik ergibt eine deutliche heterologe *cis*-Interaktion beider Moleküle miteinander. Eine zusätzliche Vermittlung durch Bindung mit ZO-1, wie sie gelegentlich vermutet wird (Raleigh *et al.*, 2011), kann nicht ausgeschlossen werden. Sie ist hier jedoch vernachlässigbar, da HEK-293-Zellen ZO-1 nur in Spuren exprimieren. Weiterhin spricht die Verwendung von C-terminal YFP-markiertem Claudin-1 bei den FRET-Messungen gegen die Beteiligung von ZO-1 bei der Occludin-Claudin-1-Assoziation. Das *tag* führt zur sterischen Inhibition der Bindung der PDZ-Domänen von ZO-1 an die C-terminal lokalisierte PDZ-Bindungsdomäne von Claudin-1 (Itoh *et al.*, 1999). Eine Bindung zwischen beiden Proteinen ist so nicht möglich (Sasaki *et al.*, 2003). Der Nachweis der direkten Assoziation zwischen Occludin und Claudin-1 wird durch Ergebnisse von Harris *et al.* (2010) bestätigt und ist Voraussetzung für eine direkte Wirkung von Occludin auf Claudin-1. Die direkte Bindung der EZS2 von Occludin mit Claudin-1 wurde postuliert (Nusrat *et al.*, 2005), während Kopräzipitation eines C-terminalen Bereichs von Occludin mit Claudin-1 bereits nachgewiesen werden konnte (Raleigh *et al.*, 2011). Furuse und Mitarbeiter (1998) transfizierten Claudin-1 und Claudin-2 in ZO-1 freie L-Fibroblasten, was in der Bildung von TJ-Netzwerken und Zellaggregationen resultierte. Bei Koexpression dieser Claudine mit Occludin detektierten sie sowohl Claudine als auch Occludin in diesen TJ-Strängen. Dies ist eine weitere Unterstützung der Annahme einer direkten Interaktion von Claudin-1 mit Occludin sowie der Beteiligung Occludins an der Ausbildung der Claudin-1-Stränge und damit an der Ausbildung der transzellulären Dichtheit. Neben der ausbleibenden Strangbildung von Occludin-monotransfizierten HEK-293-Zellen ist Occludin allein, im Gegensatz zu Claudin-1, nicht in der Lage, die Diffusion von Cellmask in den parazellulären Spalt zu verzögern. Dies spricht gegen eine abdichtende Funktion von Occludin. Es lässt sich schlussfolgern, dass Claudin-1 im Vergleich zu Occludin wesentlich fester in Strängen organisiert ist. Dieser Befund wird durch die im Vergleich zu Claudin-1 deutlich erhöhte Mobilität von Occludin in der Plasmamembran unterlegt, die auch von anderen Autoren ermittelt wurde (Shen *et al.*, 2008). Unterstützend dazu finden Cording *et al.* (2013), dass sich Kotransfektion von Claudin-1 mit Occludin in HEK-293-Zellen im Vergleich zu Occludin-monotransfizierten Zellen verringern auf die Mobilität von Occludin auswirkt.

Zusammenfassend belegen die eigenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum physiologischen Einfluss der Cysteinaustauschmutanten, dass sich die Alterationen von

Occludin auf das gesamte TJ-Ensemble auswirken. Occludin kann die Morphologie von TJ-Strängen sowie die Dichtheit der TJs beeinflussen, trotzdem es allein nicht in der Lage ist TJ-Stränge zu bilden. Andererseits wird Occludin auch von den Claudinen beeinflusst. Die Ergebnisse deuten daher auf eine regulatorische Funktion und weniger auf eine direkte Beteiligung von Occludin an der Barrierebildung hin.

4.4 Regulation der Homodimerisierung von Occludin und seiner strukturgebenden Assoziation zu ZO-1 durch Caseinkinase2-gesteuerte Occludinphosphorylierung

Es wird angenommen, dass Hypoxie Einfluss auf Signalkaskaden der Phosphorylierung nehmen kann. So verhindert z.B. Inhibition der MLCK die hypoxiebedingte Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke (Kuhlmann *et al.*, 2007). Weiterhin wurde beobachtet, dass die ZO-1-Phosphorylierung 3 h nach Hypoxiebeginn ihren Höhepunkt erreicht (Fischer *et al.*, 2002). Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Phosphorylierung ist bisher nur unzureichend untersucht. Bekannt ist, dass die Caseinkinasen (CK) 1 und 2 Occludin phosphorylieren (Feldman *et al.*, 2005). Sie sind typische Vertreter der Serin-/Threoninkinasen. Für die CK2 ist eine direkte Aktivierbarkeit durch Hypoxie nachweisbar (Pluemsampant *et al.*, 2008). Die vorliegende Arbeit stellt die Homodimerisierung und die Interaktion von Occludin mit ZO-1 erstmalig unter Einfluss CK2-abhängiger Serin- und Threonin-Phosphoregulation dar.

Für die CK2 publizierten Dörfel und Mitarbeiter (2013) ein Interaktionsmotif am cytosolischen C-terminalen Teil von Occludin kurz vor der *coiled coil*-Domäne. Das humane Motif hat die Sequenz 399-T-x-x-x-T-x-x-x-S-409 und wird von der CK2 phosphoryliert. Im Rahmen der Arbeit werden nun Mutanten untersucht, die diese Phosphorylierung blockieren (T400AT404AS408A; dreifach-A genannt) und imitieren (T400ET404ES408E; dreifach-E bzw. S408E).

FRET-Experimente verdeutlichen, dass die Homooligomerisierung von Occludin durch Imitation der Phosphorylierung der Reste Threonin400, Threonin404 und Serin408 gestört wird. Für diesen Effekt ist allein die Phosphorylierungsimitation am Serin408 (human) ausreichend, da sich die FRET-Effizienz zwischen wt und TripE nicht von der FRET-Effizienz zwischen wt und S408E unterscheidet. Unterstützung erfährt dieses Ergebnis durch *pull-down*-Experimente von Dörfel *et al.* (2013), in denen rekombinant erzeugte, GST-fusionierte C-Termini von Occludin verwendet werden, um Occludin aus stabil FLAG-Occludin^{wt}-transfizierten HEK-293-Zellen zu präzipitieren. Die rekombinanten Proteine, welche Phosphorylierung imitieren (T400E/T404E/S408E), binden schlechter an Occludin als

jene, die Phosphorylierung unmöglich machen (T400A/T404A/S408A). Bezüglich der Homodimerisierung von Occludin hat die CK2-bedingte Phosphorylierung also eine hemmende Wirkung. Experimente von Raleigh *et al.* (2011) führen zu vergleichbaren Ergebnissen: Die Mobilität von Occludin in Caco-2-Zellen wird durch CK2-Hemmung verringert. Die von ihnen erzeugten Mutanten T404A/S408A und S408A führen ebenfalls zu diesem Effekt. Begründet wird dieser Effekt in der Arbeit von Raleigh *et al.* damit, dass unphosphoryliertes Occludin an ZO-1 binden kann und Occludin somit in der Zellmembran verankert wird. Somit wird die Bindung zu verschiedenen strangintegrierten Claudinen ermöglicht, was zu Mobilitätsverminderung führt (Raleigh *et al.*, 2011). Diese Annahme bestätigten die FRET-Untersuchungen in Bezug auf die Mutante T400A/T404A/S408A und ZO-1. Zwischen diesen beiden Proteinen ist, in Analogie zu Occludin^{wt} und ZO-1, mittels FRET-Messungen eine ungestörte Assoziation detektierbar. Ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen von Raleigh *et al.* (2011) sind die bei uns durchgeführten FRET-Untersuchungen, die zeigen, dass die S408E-Mutante nicht mehr mit ZO-1 assoziiert. Allerdings bindet die dreifach-E-Mutante im Vergleich mit dem wt unverändert an ZO-1 und wird somit in die TJ integriert. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass dreifach phosphoryliertes Occludin, anders als einfach phosphoryliertes Occludin, unlöslich in Triton-X-100 ist (Dörfel *et al.*, 2013). TJ-integrierte Proteine sind unlöslich in nichtionischen Detergenzien, wie z.B. Triton-X-100 (Andreeva *et al.*, 2001). Eine Studie von Tash und Mitarbeitern (2012) engt den mit ZO-1 interagierenden Bereich humanen Occludins auf die AS 468-475 ein. Demnach hätte die CK2-induzierte Phosphorylierung einen eher indirekten, regulatorischen Effekt auf die Interaktion, wobei die Phosphorylierung vielleicht zur Konformationsänderung des Bindungsareals führt. Eine andere Arbeit beschreibt Occludins AS 406-488 als den primär mit ZO-1 interagierenden Bereich (Müller *et al.*, 2005). Da Occludin über diesen Bereich dimerisiert (Nusrat *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2009), ist eine CK2-abhängige Regulation dieser Dimerisierung oder eine Interaktion vielleicht nur des Dimers mit anderen TJ-Proteinen denkbar (Dörfel *et al.*, 2013). Insgesamt wird Occludin durch Phosphorylierung des Phosphorylierungsclusters reguliert. Eine Phosphoregulation von Occludin wird auch von anderen Autoren für andere Proteinkinasen gefunden (Antonetti *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung der o.g. Reste reduziert Occludins Homooligomerisierung und Interaktion zu ZO-1. ZO-1 ist ein wichtiges Gerüstprotein, welches verschiedene TJ-Proteine miteinander verbindet und die TJs am Cytoskelett verankert (Hartsock *et al.*, 2008). Da die Bindung zwischen Occludin und ZO-1 somit wichtig für die TJ-Architektur und -Regulation ist (Furuse *et al.*, 1994; Umeda *et al.*,

2006; VanItallie *et al.*, 2009), kann die CK2-abhängige Phosphorylierung von Occludin als grundlegender Regulationsmechanismus für die Struktur und Funktion der TJs betrachtet werden. Untersuchungen des Einflusses der CK2-regulierten Homooligomerisierung von Occludin auf funktionelle Parameter wären hilfreich, die Bedeutung der Occludinphosphorylierung für die TJs besser verstehen zu können.

4.5 Eigenschaften der Occludinmutante Y220A

Die in Kap. 4.1 diskutierten Ergebnisse weisen auf die Bedeutsamkeit der EZS2 für die Bindungsfähigkeit von Occludin hin. Mit dem Tyrosin220 untersuchen wir einen weiteren hochkonservierten Aminosäurerest dieses Bereiches auf seine Bindungseigenschaften. Das Tyrosin wird von der Bindungsstruktur der EZS2 exponiert. Es ist im erarbeiteten molekularen Modell der EZS2 von außen erreichbar. Yaffe *et al.* (2012) postulieren ebenfalls mögliche Interaktionen durch extrazellulär exponierte Tyrosinreste. In der vorliegenden Arbeit werden die Auswirkungen des Y220A Austausches insbesondere auf Oligomerisierung und Membranlokalisation unter Normoxie und Hypoxie betrachtet.

Bezüglich Membranlokalisation, *cis*-Interaktion, Membranmobilität und des Dimeranteils unter Normoxie lässt sich kein Effekt der Mutante im Vergleich zum wt feststellen. Einzig die *trans*-Interaktion wird durch den Austausch des Tyrosins reduziert. Dies ist durch die Lokalisation dieses Aminosäurerestes innerhalb des EZS2-Modells erklärbar, da die *trans*-Interaktion maßgeblich durch Assoziation der extrazellulären Bereiche zustande kommt. Dies wurde für JAM-A und Claudin-5 bereits gezeigt (Prota *et al.*, 2003; Piontek *et al.*, 2008).

Bei Untersuchung der Y220A-Mutante fällt auf, dass eine Reaktion auf hypoxische Bedingungen, wie sie für den Occludin^{wt} auftritt, bei Messung der Membranlokalisation und bei der Untersuchung der *trans*- und *cis*-Interaktionen nicht mehr detektierbar ist. Die Mutante übt also unter Hypoxie auf die gemessenen Parameter einen protektiven Effekt auf Occludin aus. Dies deutet darauf hin, dass Tyrosin220 nicht nur hydrophobe Interaktionen bedingt, sondern auch anderweitig reguliert wird. Wie beim wt ist auch bei der Mutante unter Hypoxie eine verstärkte Dimerbildung feststellbar. Diese vermehrte Dimerisierung wird durch die Ergebnisse der *trans*-Interaktion widerspiegelt. Hypoxie fördert die Bildung von *trans*-Interaktionen.

Als Ursache der Schutzfunktion der Y220A-Mutation für Occludin unter Hypoxie könnte Tyrosinnitrosifizierung in Betracht kommen. Diese Modifikation ist im Gegensatz zur Phosphorylierung extrazellulär möglich (Vliet *et al.*, 1995; Yeo *et al.*, 2008) und tritt vermehrt

bei oxidativem Stress auf (Gow *et al.*, 1996). Die Bestimmung von Nitrotyrosin wird auch als Marker für oxidativen Stress eingesetzt (Chen *et al.*, 2010). Die Tyrosinnitrifizierung ist ein selektiver Prozess, der von Faktoren wie dem pH-Wert, Konkurrenz und sterischen Behinderungen abhängig ist (Souza *et al.*, 1999). Nitrifizierung verändert grundlegende Eigenschaften eines Tyrosinrestes, wie z.B. den pK(a)-Wert der Phenolgruppe, das Redoxpotential, die Hydrophobizität und das Volumen (Radi *et al.*, 2013). Aus der Literatur ist bekannt, dass bereits einzelne Nitrotyrosine zu radikalen Änderungen in der Struktur und Funktion von Proteinen führen können (Yeo *et al.*, 2008). Es ist z.B. bekannt, dass sich Tyrosinmodifikationen im Rahmen der Proteinoligomerisierung negativ regulierend auswirken, also meist zum Zerfall von Oligomeren führen. Dadurch sind sie mit verschiedenen pathologischen Bedingungen verbunden (Yeo *et al.*, 2008). So wurde z.B. 3-Nitrotyrosin in zahlreichen menschlichen und tierischen Krankheitsmodellen identifiziert. Die fehlende hypoxiebedingte Reaktion von Occludin bei der Y220A-Mutante könnte evtl. auf eine Nitrifizierung des Tyrosins220 in Occludin unter Hypoxie hinweisen und spricht für eine regulatorische Rolle dieses Restes. Nach Substitution des Tyrosins wäre eine Nitrifizierung unmöglich, wodurch die o.g. negative Regulation der Nitrifizierung blockiert würde.

Tyrosinnitrifizierung der Proteinphosphatase PP2A wird mit dem Anstieg der Aktivität dieser Phosphatase in Verbindung gebracht (Wu und Wilson, 2008), der sich direkt auf eine verstärkte Dephosphorylierung von Occludin auswirkt (Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2002). Diese Dephosphorylierung korreliert mit der Relokalisation von Occludin ins Cytosol.

Erforschung der EZS2 und einer eventuellen Nitrifizierung ist notwendig. Da Tyrosinnitrifizierung als Indikator für oxidativen Stress angesehen werden kann (Gow *et al.*, 1996), würde der Nachweis einer Nitrifizierung die Rolle Occludins als Sensor für veränderte Redoxbedingungen weiter spezifizieren. Zur weiterführenden Untersuchung dieses Restes bezüglich seiner Nitrifizierbarkeit wären massenspektrometrische Analysen hilfreich.

4.6 Dichtheitsmessungen mittels Cellmask-Diffusionsassay an occludintransfizierten HEK-293-Zellen

Es ist bekannt, dass in unpolare Zellen transfizierte Claudine TJ-Stränge bilden können (Furuse *et al.*, 1998 und Piontek *et al.*, 2008). Diese Stränge entsprechen jedoch nicht dem kontinuierlichen gürtelförmigen Phänotyp der TJ-Stränge in endogen TJ-exprimierenden Epi- oder Endothelzellen. Sowohl die Länge der Stränge als auch ihr Verzweigungsgrad erreichen nicht die Ausmaße, wie sie in endogen TJ-exprimierenden Zellen zu finden sind. Die Ursache

dafür liegt wahrscheinlich in der fehlenden Expression weiterer TJ-Proteine, die die Strangorganisation regulieren. An dieser Stelle sei auf die regulatorischen Wechselbeziehungen zwischen Occludin und Claudinen verwiesen (Kap. 4.3; Cording *et al.*, 2013). Es ist in diesen Zellsystemen nicht möglich, die durch transfizierte Transmembranproteine der TJs gebildete Dichte eines Zellmonolayers durch konventionelle Transwellsysteme zu bestimmen, da sich stabile Widerstände nicht ausbilden. Piontek und Mitarbeiter stellten 2011 mit dem Cellmask-Diffusionsassay eine neue Methode vor, Barrierefunktionen von einzeln transfizierten TJ-Proteinen und dadurch molekular definierten TJ-Strängen zu bestimmen.

In meinen Untersuchungen weist Occludin im Vergleich zu Claudin-1 eine deutlich schnellere und stärkere Cellmask-Kontaktfärbung auf. Grund dafür ist die intensivere Abdichtung des parazellulären Spaltes gegen Cellmask durch Claudin-1 im Vergleich zu Occludin. Der Farbstoff kann in besser abdichtende Zell-Zellkontakte erst später diffundieren. Diese Diffusionsbarriere kommt durch stärkere und dichter organisierte homophile *trans*-Interaktionen von Claudin-1 zustande (Cording *et al.*, 2013). Es lässt sich schlussfolgern, dass Claudin-1 im Vergleich zu Occludin fester in Stränge eingebunden ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die sehr viel geringere Mobilität von Claudin-1 im Vergleich zu Occludin in der Plasmamembran (Shen *et al.*, 2008) an Zell-Zellkontakten und die fehlende Strangbildung durch Occludin gestützt. Occludin scheint also indirekt über Claudin-1 in die Regulation des transzellulären Widerstandes einzugreifen (siehe Kap. 4.3), wie es von anderen Autoren vermutet wird (Yu *et al.*, 2005).

Die stärkere Cellmaskfärbung von Zellkontakten mit angereichertem Occludin lässt sich durch eine veränderte Membranstruktur nach Überexpression von Occludin erklären, die mehr Durchlässigkeit gegenüber dem Membranfarbstoff besitzt. Experimente die von unserer Gruppe durchgeführt wurden, führten zum Verschwinden der Cellmaskfärbung nach Extraktion von Cholesterol mittels Methyl- β -cyclodextrin. Cellmask scheint cholesterolreiche Zellmembranen besonders effizient zu färben. Occludin ist ein Bestandteil von detergenzresistenten, cholesterolreichen Membranmikrodomänen in der Plasmamembran (Nusrat *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2005). Weiterhin sind die Phosphorylierung Occludins sowie seine Lokalisation in der Plasmamembran cholesterolbegünstigt (Lynch *et al.*, 2007). Das Auftreten von Occludin scheint demnach mit Cholesterol korelliert zu sein. Dies erklärt die effiziente Anfärbung der occludinangereicherten Zell-Zellkontakte und spricht gegen eine direkte Barrierebildung durch Occludin.

Andere Studien unterstützen einen Zusammenhang zwischen Cholesterol und Occludinreicherung und weisen auf die Wichtigkeit von cholesterolreichen Membrandomänen für die TJ-Funktion hin. Beispielsweise führt Cholesterolunterdrückung in MDCK-II-Zellen zu abgesenkten TEER-Werten, hat aber keinen Effekt in MDCK-II-Zellen mit Occludin *knockdown* (Yu *et al.*, 2005). Koimmunopräzipitation zeigt eine Interaktion von Occludin mit dem cholesterolbindenden Protein Caveolin-1 (Nusrat *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2007). Die Inkubation mit 10mM Methyl- β -cyclodextrin für 2 h auf der apikalen und basalen Zellseite von MDCK-II-Zellen (Casas *et al.*, 2010) führt zu 80%-iger Reduktion von Cholesterol, zum Einbruch der TEER-Werte und zu 30%-iger Reduktion von Occludin in der Zelle. Claudine sind weitaus weniger betroffen (Casas *et al.*, 2010). Vernachlässigbar geringe Veränderungen ergeben sich bei Aktin, GP-135 (MDCK-Zell-Membranglycoprotein) und Caveolin-1 (Casas *et al.*, 2010). Es bleibt in diesen Untersuchungen jedoch unklar, ob Occludin eine aktive oder passive Rolle bei der Organisation dieser Mikrodomäne spielt. Während der normale *turnover* des membranständigen Occludins durch intrazelluläre Proteolyse und Neusynthese realisiert wird, gibt es Hinweise darauf, dass die Relokalisation ins Cytosol in cholesterolunterdrückten Zellen durch direkte Freisetzung von Occludin als Bestandteil membrangebundener Partikel nach außen geschieht. Occludin und zwei seiner Degradationsprodukte steigen im basolateralen Medium nach Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin für 30 min stark an (Casas *et al.*, 2010).

Zusammenfassend stützen unsere Ergebnisse frühere Untersuchungsergebnisse, dass Claudin-1 fester als Occludin in TJ-Strängen organisiert ist und Occludin seine Barriereigenschaften indirekt beeinflusst.

4.7 Heterologe cysteinbedingte Interaktion von Occludin mit MarvelD3

Abschließend liefern die Ergebnisse erstmals molekulare Belege für die Cysteinabhängigkeit der von Anderen beschriebenen Assoziation zwischen Occludin und MarvelD3 (Raleigh *et al.*, 2010). Den geringsten Einfluss auf die beschriebene Interaktion hat der Austausch des Cysteins82 der humanen Sequenz gegen Alanin. Dieser transmembranale Aminosäurerest scheint maßgeblich für die Homodimerisierung von Occludin von Bedeutung zu sein, nicht hingegen für seine heterologe Interaktion mit Claudin-1 oder MarvelD3. Bei den Occludinmutanten C76A, C148A (TMD1 und -2) und C216A (EVS2) ist nahezu keine FRET-Effizienz mit MarvelD3^{wt} mehr detektierbar. Die Cysteine dieser Positionen sind somit direkt oder indirekt an der Interaktion mit MarvelD3 beteiligt. Im Fall der Mutante C216A könnte

4. Diskussion

die stark reduzierte heterologe *cis*-Interaktion jedoch auch auf der verminderten Membranständigkeit dieser Mutante in HEK-293-Zellen beruhen. Durch die mutationsbedingte Lokalisationsänderung von Occludin in der Zelle ist die Verfügbarkeit des sehr homogen membranverteilten MarvelD3 für diese Mutante deutlich reduziert.

Ob die durch die Mutanten veränderten Interaktionen zwischen Occludin und MarvelD3 auf polaren Wechselwirkungen beruhen, welche die Cysteine eingehen können, auf Wasserstoffbrücken basieren oder das Resultat von redoxabhängigen Disulfidbrücken sind, kann nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse stellen jedoch einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, wie z.B. die Analyse von Cystein zu Serin-Mutanten oder Western Blot Untersuchungen mit und ohne DTT dar. Auch massenspektrometrische Untersuchungen mit und ohne DTT könnten Disulfidbrücken direkt bestätigen oder ausschließen. Alaninscans in Claudinen und den weiteren TAMPs wären hilfreich, Interaktionsdomänen der Claudin/Claudin, TAMP/TAMP und Claudin/TAMP Assoziation zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

TJs sind Multiproteinkomplexe, die die parazelluläre Permeation hydrophiler Substanzen über Endo- und Epithelien regulieren. Sie determinieren die Zellpolarität und sind an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Die Rolle des TJ-Markerproteins Occludin ist unklar.

Die Arbeit analysiert insbesondere die Interaktionseigenschaften von Occludin nach systematischem Alanin-Scan hochkonservierter Cysteine. Weiterhin wurde die Regulation dieser Eigenschaften sowohl durch Hypoxie und Reduktantien als auch durch Phosphorylierung untersucht. Ein zusätzlicher Aspekt ist die Analyse der Auswirkungen der Cysteinsubstitutionen auf funktionelle Parameter (Dichtheit, Diffusibilität) und die Strangmorphologie.

Die Untersuchungen ergaben, dass die EZS2 von Occludin eine cysteinabhängige und somit redox-sensitive Oligomerisierungsdomäne darstellt. Die Ausbildung einer abgeschirmten, intramolekularen Disulfidbrücke zwischen beiden EZS2-lokalisierten Cysteinen (Cystein216 und -237) bedingt eine aus zwei β -Strängen und einer α -Helix bestehende Struktur. Diese bestimmt die *trans*- und *cis*-Interaktionen sowie die Membranlokalisation und -mobilität von Occludin und geht unter reduzierenden Bedingungen (Hypoxie, DTT) verloren. Die Disulfidbrücke kann als Ursache der Redoxsensitivität von Occludin angesehen werden. Die Gesamtheit der Resultate bezüglich der EZS2 führte zur Konstruktion eines ersten molekularen Modells.

Das Cystein82 (TMD1) wurde als Bestandteil einer weiteren Interaktionsfläche von Occludin, innerhalb der Zellmembran, identifiziert. Diese Interaktion ist jedoch nicht redoxsensitiv, sondern beruht möglicherweise auf intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Resten. Der Austausch von Cystein82 wirkt sich nur auf die homologen *cis*-Interaktionen, nicht aber auf die homologen *trans*-Interaktionen aus.

Die Cysteine76 (TMD1) und -148 (TMD2) verstärken die *trans*-Interaktion von Occludin, sind aber nicht redoxsensitiv. Die starke Zunahme der *trans*-Interaktion nach Austausch gegen Alanin scheint Ergebnis einer durch die Mutationen wegfallenden räumlichen Behinderung zu sein.

Es konnte belegt werden, dass sich reduzierende Bedingungen direkt auf bereits membranständiges Occludin auswirken. Durch den Verlust der Disulfidbrücke verändert sich die EZS2-Struktur, was zur Internalisierung von Occludin führt. Dieses Resultat unterstreicht das Konzept von Occludin als Redoxsensor.

Untersuchungen mittels FRET ergeben eine Interaktion zwischen Occludin und Claudin-1. Weiterhin ist ein deutlich verstärkender Einfluss der Occludin^{C76A} Mutante, auf die Strangdichte und -länge von Claudin-1 in HEK-Zellen und den transzellulären Widerstand von MDCK-II-Zellen nachweisbar.

FRET-Messungen zwischen ZO-1 und Occludinmutanten, die CK2-Phosphorylierung imitieren bzw. inhibieren, zeigten reduzierte Heterooligomerisierung durch Imitation der CK2-Phosphorylierung. Auch die Homooligomerisierung von Occludin ist CK2-beeinflusst. Das heißt, CK2-bedingte Phosphorylierung beeinträchtigt die TJ-Ausbildung.

Die Mutante Y220A (Bestandteil der EZS2-Tertiärstruktur) vermindert die homophile *trans*-Interaktion sowie deren Redoxsensitivität unter Hypoxie.

Die Cysteine76, -82 und -216 von Occludin beeinflussen dessen Interaktion mit MarvelD3. Für Cystein82 konnte ein Einfluss auf die heterologe Interaktion von Occludin mit Claudin-1 ausgeschlossen werden.

Insgesamt trägt die Analyse cysteinbasierter Interaktionen durch Identifikation heterologer und homologer Interaktionsbereiche dazu bei die molekulare und regulatorische Organisation von TJs besser zu verstehen.

6 Summary

TJs are multiprotein complexes regulating the epi-/endothelial permeation of hydrophilic substances. They determine cell polarity and play a central role in lots of physiologic and pathologic processes. The role of occludin, a marker protein of TJs, is unclear.

Particularly, interaction properties of occludin were studied by systematic alanine scan of highly conserved cysteine residues. Furthermore, regulation of these properties by hypoxia/and/or reductants as well as phosphorylation were analyzed. An additional aspect is the investigation of the impact of the cysteine substitution on functional parameters (i.e. tightness) and strand morphology.

The results show, that the ECL2 of occludin is a cysteine-dependent and thus redox-sensitive oligomerization domain. Formation of a shielded intramolecular disulfide bridge between the ECL2 localized cysteines 216 and -237 causes a tertiary structure, consisting of two β -strands and an α -helix. This structure determines the *cis*- and *trans*-interactions as well as membrane localization and mobility at cell cell-contacts and gets lost under reducing conditions (i.e., hypoxia, DTT). This disulfide bridge is thought to base the redox sensitivity of occludin. The ECL2-related results led to the construction of the first molecular model of this loop.

Cysteine 82 (TMD1) is part of another interaction face of occludin within the cell membrane. The interaction based on this residue is not redox sensitive but probably based on intermolecular hydrogen bonds with neighbored residues. The only impact of cysteine 82-substitution was the reduction of homologous *cis*-interactions. *Trans*-interactions were unaffected.

Cysteines 76 (TMD1) and -148 (TMD2) enhance homologous *trans*-interactions, but are not redox sensitive. The strong increment of the *trans*-interactions after substitution of cysteine by alanine seems to be the result of a mutation-based abolition of a spatial hindrance.

It could be proven, that reducing conditions influence membrane incorporated occludin. The ECL-2 structure changes by the loss of the disulfide bridge, which leads to the internalization of occludin. This result emphasizes the concept of occludin as redox sensor.

FRET-investigations show an interaction between occludin and claudin-1. The occludin C76A mutant increases the claudin-1-based strand-density and -length in HEK-cells and the TEER in MDCK-II-cells.

Associations between ZO-1 and occludin mutants, imitating or inhibiting CK2-phosphorylation measured by FRET, show reduced heterooligomerization and

6. Summary

homooligomerization of occludin due to imitation of CK2-phosphorylation. This means, phosphorylation by CK2 modulates TJs.

The mutant Y220A (part of the ECL2 tertiary structure) reduces homophilic *trans*-interactions and their redox sensitivity under hypoxia.

Occludins cysteines76, -82 and -216 influence the interaction with marvelD3. For cysteine82, an influence on the interaction between occludin and claudin-1 could be excluded.

In conclusion, the analysis of cysteine-based interactions leads to a better understanding of the molecular and regulatory organization of TJs by identification of heterologous and homologous interaction sites.

7. Literaturverzeichnis

Ahdieh M., Vandenbos T., and Youakim A. (2001): Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281: C2029-C2038.

Ahmad T., Kumar M., Mabalirajan U., Pattnaik B., Aggarwal S., Singh R., Singh S., Mukerji M., Ghosh B., Agrawal A. (2012): Hypoxia response in asthma: differential modulation on inflammation and epithelial injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 47(1): 1-10.

Alam K., Ghousunnissa S., Nair S., Valluri V.L., Mukhopadhyay S. (2010): Glutathione-redox balance regulates c-rel-driven IL-12 production in macrophages: possible implications in antituberculosis immunotherapy. *J Immunol.* 184: 2918-2929.

Anderson J.M., Van Itallie C.M. (1995): Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.-Gastr L.* 269: G467-G475.

Anderson, J. M. (1996): Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol.* 6(4): 382-384.

Andreeva A.Y., Krause E., Müller E.C., Blasig I.E., Utepbergenov D.I. (2001): Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem.* 276(42): 38480-38486.

Andreeva A.Y., Piontek J., Blasig I.E., Utepbergenov D.I. (2006): Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(2): 222-233.

Angelow, S., El Hussein R., Kanzawa S.A., Yu A.S. (2007): Renal Localization And Function Of The Tight Junction Protein, Claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293: F166-F177.

Angelow S., Ahlstrom R., Yu A.S. (2008): Biology of Claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295(4): F867-F876.

Antonetti D.A., Barber A.J., Hollinger L.A., Wolpert E.B., Gardner T.W. (1999): Vascular Endothelial Growth Factor Induces Rapid Phosphorylation of Tight Junction Proteins Occludin and Zonula Occludens 1. A Potential Mechanism for Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy and Tumors. *J Biol Chem.* 274: 23463-23467.

Bacallao R., Sohrab S., Phillips C. (2006): Guiding Principles of Specimen Preservation for Confocal Fluorescence Microscopy. Handbook of Biological Confocal Microscopy, Third Edition, edited by James B. Pawley, Springer Science; Business Media, LLC, New York.

Bailey D.M. (2000): Acute mountain sickness the “poison of the pass”. *West J Med.* 172(6): 399-400.

- Bal M.S., Castro V., Piontek J., Rueckert C., Walter J.K., Shymanets A., Kuhrig B., Haase H., Nürnberg B., Blasig I.E. (2012):** The hinge region of the scaffolding protein of cell contacts, zonula occludens protein 1, regulates interacting with various signaling proteins. *J Cell Biochem.* 113: 934-945.
- Balda M.S., Whitney J.A., Flores C., Gonzalez S., Cereijido M., Matter K. (1996):** Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 134: 1031-1049.
- Balda M.S., Garrett M.D., Matter K. (2003):** The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol.* 160(3): 423-432.
- Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. (2004):** The blood-brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16(1): 1-13.
- Ballard S.T., Hunter J.H., Taylor A.E. (1995):** Regulation of Tight-Junction Permeability During Nutrient Absorption Across the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Nutr.* 15: 35-55.
- Barrios-Rodiles M., Brown K.R., Ozdamar B., Bose R., Liu Z., Donovan R.S., Shinjo F., Liu Y.M., Dembowy J., Taylor I.W., Luga V., Przulj N., Robinson M., Suzuki H., Hayashizaki Y., Jurisica I., Wrana J.L. (2005):** High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 307: 1621-1625.
- Basuroy S., Sheth P., Kuppaswamy D., Balasubramanian S., Ray R.M., Rao R.K. (2003):** Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer. *J Biol Chem.* 278(14): 11916-11924.
- Basuroy S., Seth A., Elias B., Naren A.P., Rao R. (2006):** MAR interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 393: 69-77.
- Bauer A.T., Burgers H.F., Rabie T., Marti H.H. (2010):** Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J Cerebr Blood Flow Metab.* 30: 837-848.
- Bazzoni G., Martinez-Estrada O.M., Orsenigo F., Cordenonsi M., Citi S., Dejana E. (2000):** Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem.* 275(27): 20520-20526.
- Beeman N.E., Baumgartner H.K., Webb P.G., Schaack J.B., Neville M.C. (2009):** Disruption of occludin function in polarized epithelial cells activates the extrinsic pathway of apoptosis leading to cell extrusion without loss of transepithelial resistance. *BMC Cell Biology* 10: 85.
- Bellmann C., Schreivogel S., Günther R., Dabrowski S., Schümann M., Wolburg H., Blasig I.E. (2013):** Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occluding-redox dependency of the second extracellular loop. *Antioxid Redox Signal.*; in press

Ben Yosef T., Belyantseva I.A., Saunders T.L., Hughes E.D., Kawamoto K., Van Itallie C.M., Beyer L.A., Halsey K., Gardner D.J., Wilcox E.R., Rasmussen J., Anderson J.M., Dolan D.F., Forge A., Raphael Y., Camper S.A., Friedman T.B. (2003): Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet.* 12: 2049-2061.

Berney C., Danuser G. (2003): FRET or no FRET: A Quantitative Comparison. *Biophys J.* 84(6): 3992-4010.

Billings S.D., Walsh S.V., Fisher C., Nusrat A., Weiss S.W., Folpe A.L. (2004): Aberrant expression of tight junction-related proteins ZO-1, claudin-1 and occludin in synovial sarcoma: an immunohistochemical study with ultrastructural correlation. *Mod Pathol.* 17: 141-149.

Blasig I.E., Winkler L., Lassowski B., Mueller S.L., Zuleger N., Krause E., Krause G., Gast K., Kolbe M., Piontek J. (2006): On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci.* 63(4): 505-514.

Blasig I.E., Bellmann C., Cording J., del Vecchio G., Zwanziger D., Huber O., Haseloff R.F. (2011): Occludin Protein Family: Oxidative Stress and Reducing Conditions. *Antioxid Redox Signal.* 15(5): 1195-1219.

Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. (1999): Sequence and structure based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 294: 1351-1362.

Blume L.F., Denker M., Gieseler F., Kunze T. (2010): Temperature corrected transepithelial electrical resistance (TEER) measurement to quantify rapid changes in paracellular permeability. *Pharmazie* 65(1):19-24.

Brandner J.M., Kief S., Grund C., Rendl M., Houdek P., Kuhn C., Tschachler E., Franke W.W., Moll, I. (2002): Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 81: 253-263.

Brast S., Grabner A., Sucic S., Sitte H.H., Hermann E., Pavenstädt H., Schlatter E., Giarimboli G. (2012): The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *FASEB J.* 26: 976-986.

Brown R.C., Davis T.P. (2002): Calcium Modulation of Adherens and Tight Junction Function: A Potential Mechanism for Blood-Brain Barrier Disruption After Stroke. *Stroke* 33: 1706-1711.

Brown R.C., Davis T.P. (2005): Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 327(4): 1114-1123.

Bruewer M., Utech M., Ivanov A.I., Hopkins A.M., Parkos C.A., Nusrat A. (2005): Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via macropinocytosis-like process. *FASEB J.* 19: 923-933.

Brunk U., Collins V.P., Arro E. (2011): The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. *J Microsc.* 123(2): 121-131.

- Bürgel N., Bojarski C., Mankertz J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. (2002):** Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 123: 433-443.
- Burgoyne J.R., Madhani M., Cuello F., Charles R.L., Brennan J.P., Schröder E., Browning, D.D., Eaton P. (2007):** Cysteine redox sensor in PKGI α enables oxidant-induced activation. *Science* 317: 1393-1397.
- Busch C., Hanssen T.A., Wagener C., Obrink B. (2002):** Downregulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol.* 33: 290-298.
- Bush-Pelc L.A., Marino F., Chen Z., Pineda A.O., Mathews F.S., Di Cera E. (2007):** Important role of the cys-191 cys-220 disulfide bond in thrombin function and allostery. *J Biol Chem.* 282: 27165-27170.
- Capaldo C.T., Nusrat A. (2009):** Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1788(4): 864-871.
- Caraballo J.C., Yshii C., Butti M.L., Westphal W., Borchering J.A., Allamargot C., Comellas A.P. (2011):** Hypoxia increases transepithelial electrical conductance and reduces occludin at the plasma membrane in alveolar epithelial cells via PKC- ζ and PP2A pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 300(4): L569-L578.
- Casas E., Barron C., Francis S.A., McCormack J.M., McCarthy K.M., Schneeberger E.E., Lynch R.D. (2010):** Cholesterol efflux stimulates metalloproteinase-mediated cleavage of occludin and release of extracellular membrane particles containing its C-terminal fragments. *Exp Cell Res.* 316(3): 353-365.
- Castello G., Scala S., Palmieri G., Curley S.A., Izzo F. (2010):** HCV-related hepatocellular carcinoma: from chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol.* 134: 237-250.
- Chan F.K.M., Siegel R.M., Zacharias D., Swofford R., Holmes K.L., Tsien R.Y., Lenardo M.J. (2001):** Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Cell Surface Receptor Interactions and Signaling Using Spectral Variants of the Green Fluorescent Protein. *Cytometry* 44: 361-368.
- Chen Y., Merzdorf C., Paul D.L., Goodenough D.A. (1997):** COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol.* 138: 891-899.
- Chen S.H.M., Stins M.F., Huang S.H., Chen Y.H., Kwon-Chung K.J., Chang Y., Kim K.S., Suzuki K., Jong A.Y. (2003):** *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol.* 52: 961-970.
- Chen C.H., Anatol M., Zhan Y., Liu W.W., Ostrowski R.P., Tang J., Zhang J.H. (2010):** Hydrogen Gas Reduced Acute Hyperglycemia-Enhanced Hemorrhagic Transformation in a Focal Ischemia Rat Model. *Neuroscience* 169(1): 402-414.
- Chen Y.H., Lu Q., Goodenough D.A., Jeansonne B. (2002):** Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 13: 1227-1237.

Chen Y., Mauldin J.P., Day R.N., Periasamy A. (2007): Characterization of spectral FRET imaging microscopy for monitoring nuclear protein interactions. *J Microsc.* 228: 139-152.

Claude, P. (1978): Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol.* 39: 219-232.

Cobb M.H., Hepler J.E., Cheng M.G., Robbins D. (1994): The mitogen-activated protein-kinases, Erk1 and Erk2. *Semin Cancer Biol.* 5: 261-268.

Coeffier M., Gloro R., Boukhattala N., Aziz M., Lecleire S., Vandaele N., Antonietti M., Savoye G., Bole-Feysot C., Dechelotte P., Reimund J.M., Ducrotte P. (2010): Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 105: 1181-1188.

Cohen C.J., Shieh J.T., Pickles R.J., Okegawa T., Hsieh J.T., Bergelson J.M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98(26): 15191-15196.

Cohen T.S., Lawrence G.G., Khasgiwala A., Margulies S.S. (2010): MAPK activation modulates permeability of isolated rat alveolar epithelial cell monolayers following cyclic stretch. *PLoS One* 5: 23-42.

Coisne C., Engelhardt B. (2011): Tight junctions in brain barriers during CNS inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 15: 1285-1303.

Colegio O.R., Van Itallie C., Rahner C., Anderson J.M. (2003): Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(6): C1346-C1354.

Cordenonsi M., Mazzon E., De Rigo L., Baraldo S., Meggio F., Citi S. (1997): Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J Cell Sci.* 110: 3131-3139.

Cordenonsi M., Turco F., D'Atri F., Hammar E., Martinucci G., Meggio F., Citi S. (1999): *Xenopus laevis* occludin: identification of in vitro phosphorylation sites by protein kinase CK2 and association with cingulin. *Eur J Biochem.* 264: 374-384.

Cording J., Berg J., Käding N., Bellmann C., Westphal J.K., Milatz S., Günzel D., Wolburg H., Piontek J., Huber O., Blasig I.E. (2013): Tight Junctions: claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci.* 162: 554-564.

Dallasta L.M., Pisarov L.A., Esplen J.E., Werley J.V., Moses A.V., Nelson J.A., Achim C.L. (1999): Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol.* 155: 1915-1927.

Day R.N., Periasamy A., Schaufele F. (2001): Fluorescence resonance energy transfer microscopy of localized protein interactions in the living cell nucleus. *Methods* 25: 4-18.

DeMaio L., Rouhanizadeh M., Reddy S., Sevanian A., Hwang J., Hsiai T.K. (2006): Oxidized phospholipids mediate occludin expression and phosphorylation in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290: H674-H683.

de Oliveira S.S., Oliveira I.M., Souza W.D., Morgado-Diaz J.A. (2005): Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Letters* 579: 6179-6185.

Deschenes S.M., Walcott J.L., Wexler T.L., Scherer S.S., Fischbeck K.H. (1997): Altered trafficking of mutant connexin32. *J Neurosci.* 17: 9077-9084.

Diamond J.M. (1977): Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate and fence. *Physiologist* 20, 10-18.

Dickman K.G., Hempson S.J., Anderson J., Lippe S., Zhao L.M., Burakoff R., Shaw R.D. (2000): Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest.* 279: G757-G766.

Dohgu S., Fleegal-DeMotta M.A., Banks W.A. (2011): Lipopolysaccharide-enhanced transcellular transport of HIV-1 across the blood-brain barrier is mediated by luminal microvessel IL-6 and GM-CSF. *J Neuroinflammation* 8: 167.

Dokladny K., Moseley P.L., Ma T.Y. (2006): Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Am J Physiol - Gastr L.* 290: G204-G212.

Dominguez I., Sonenshein G.E., Seldin D.C. (2009): Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 66(11-12): 1850-1857.

Dörfel M.J., Westphal J.K., Huber O. (2009): Differential Phosphorylation of Occludin and Tricellulin by CK2 and CK1. *Ann NY Acad Sci.* 1165: 69-73.

Dörfel M.J., Huber O. (2011): Modulation of Tight Junction Structure and Function by Kinases and Phosphatases Targeting Occludin. *J Biomed Biotech*, vol. 2012, Article ID 807356, 14 pages.

Dörfel M.J., Huber O. (2012): A phosphorylation hotspot within the occludin C-terminal domain. *Ann NY Acad Sci.* 1257: 38-44.

Dörfel M.J., Westphal J.K., Bellmann C., Krug S.M., Cording J., Mittag S., Tauber R., Fromm M., Blasig I.E., Huber O. (2013): CK2-dependent phosphorylation of occludin regulates the interaction with ZO-proteins and tight junction integrity. *J Cell Commun Signal.* 11: 40.

Dragsten P.R., Blumenthal R., Handler J.S. (1981): Membrane asymmetry in epithelia: Is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294(5843): 718-722.

Dukes J.D., Whitley P., Chalmers A.D. (2012): The PIKfyve inhibitor YM201636 blocks the continuous recycling of the tight junction proteins claudin-1 and claudin-2 in MDCK cells. *PLoS One* 7: e28659.

Dupre-Crochet S., Figueroa A., Hogan C., Ferber E.C., Bialucha C.U., Adams J., Richardson E.C., Fujita Y. (2007): Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol.* 27(10): 3804-3816.

- Ebnet K., Schulz C.U., Meyer Zu Brickwedde M.K., Pendl G.G., Vestweber D. (2000):** Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem.* 275(36): 27979-27988.
- Ebnet K., Suzuki A., Horikoshi Y., Hirose T., Meyer Zu Brickwedde M.K., Ohno S., Vestweber, D. (2001):** The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* 20(14): 3738-3748.
- Ebnet K., Aurrand-Lions M., Kuhn A., Kiefer F., Butz S., Zander K., Meyer Zu Brickwedde M.K., Suzuki A., Imhof B.A., Vestweber D. (2003):** The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci.* 116(19): 3879-3891.
- Elias B.C., Suzuki T., Seth A., Giorgianni F., Kale G., Shen L., Turner J.R., Naren A., Desiderio D.M., Rao R. (2009):** Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J Biol Chem.* 284: 1559-1569.
- El-Tamer M.B., Ward B.M., Schiffner T., Neumayer L., Khuri S., Henderson W. (2007):** Morbidity and mortality following breast cancer surgery in women: national benchmarks for standards of care. *Ann Surg.* 245(5): 665-671.
- Erlbruch A., Hung C.W., Seidler J., Borrmann K., Gesellchen F., König N., Kübler D., Herberg F.W., Lehmann W.D., Bossemeyer D. (2010):** Uncoupling of bait-protein expression from the prey protein environment adds versatility for cell and tissue interaction proteomics and reveals a complex of CARP-1 and the PKA C β subunit. *Proteomics* 10(16): 2890-2900.
- Everett R.S., Vanhook M.K., Barozzi N., Toth I., Johnson L.G. (2006):** Specific modulation of airway epithelial tight junctions by apical application of an occludin peptide. *Mol Pharmacol.* 69: 492-500.
- Farquhar M.G., Palade G.E. (1963):** Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17: 375-412.
- Feldman G.J., Mullin J.M., Ryan M.P. (2005):** Occludin: Structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 883-917.
- Fischer S., Wobben M., Marti H.H., Renz D., Schaper W. (2002):** Hypoxia-Induced Hyperpermeability in Brain Microvessel Endothelial Cells Involves VEGF-Mediated Changes in the Expression of Zonula Occludens-1. *Microvasc Res.* 63: 70-80.
- Förster C., Kahles T., Kietz S., Drenckhahn D. (2007):** Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol.* 580: 937-949.
- Förster C. (2008):** Tight Junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 130: 55-70.

Fries W., Mazzon E., Squarzoni S., Martin A., Martines D., Micali A., Sturniolo G.C., Citi S., Longo G. (1999): Experimental colitis increases small intestine permeability in the rat. *Lab Invest.* 79: 49-57.

Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. (1993): Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 123: 1777-1788.

Furuse, M., Itoh M., Hirase T., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. (1994): Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at TJ. *J Cell Biol.* 127: 1617-1626.

Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K., Tsukita S. (1998): A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 143: 391-401.

Furuse, M., Sasaki H., Tsukita S. (1999): Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol.* 147: 891-903.

Furuse M. (2009): Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a002907.

Gaddie K.J., Kirley T.L. (2009): Conserved polar residues stabilize transmembrane domains and promote oligomerization in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Biochemistry* 48: 9437-9447.

Gambin Y., Lopez-Esparza R., Reffay M., Sieracki E., Gov N.S., Genest M., Hodges R.S., Urbach W. (2006): Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103(7): 2098-2102.

Gatenby R.A., Gillies R.J. (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-899.

Gatti C.D., Osto E., Kouroedov A., Eto M., Shaw S., Volpe M., Luscher T.F., Cosentino F. (2008): Pulsatile stretch induces release of angiotensin II and oxidative stress in human endothelial cells: effects of ACE inhibition and AT(1) receptor antagonism. *Clin Exp Hypertens.* 30: 616-627.

Ghassemifar M.R., Sheth B., Papenbrock T., Leese H.J., Houghton F.D., Fleming T.P. (2002): Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain. *J Cell Sci.* 115: 3171-3180.

Giebel S.J., Menicucci G., McGuire P.G., Das A. (2005): Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest.* 85: 597-607.

González J.E., DiGeronimo R.J., Arthur D.E., King J.M. (2009): Remodeling of the tight junction during recovery from exposure to hydrogen peroxide in kidney epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 47: 1561-1569.

- González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., Jaramillo B.E. (2003):** Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81: 1-44.
- Gottardi C.J., Caplan M.J. (1992):** Cell surface biotinylation in the determination of epithelial membrane polarity. *J Tissue Cult Meth.* 14(4): 173-180.
- Gottardi C.J., Arpin M., Fanning A.S., Louvard D. (1996):** The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93(20): 10779-10784.
- Gow A.J., Duran D., Malcolm S., Ischiropoulos H. (1996):** Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 385: 63-66.
- Gow A., Southwood C.M., Li J.S., Pariali M., Riordan G.P., Brodie S.E., Danias J., Bronstein J.M., Kachar B., Lazzarini R.A. (1999):** CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell* 99: 649-659.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. (1977):** Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol.* 36(1): 59-74.
- Griep E.B., Dolan W.J., Robbins E.S., Sabatini D.D. (1983):** Participation of plasma membrane proteins in the formation of tight junctions by cultured epithelial cells. *J Cell Biol.* 96(3): 693-702.
- Grocott M.P.W., Martin D.S., Levett D.Z.H., McMorrow R., Windsor J., Montgomery H.E. (2009):** Arterial blood gases and oxygen content in climbers on Mount Everest. *N Engl J Med.* 360: 140-149.
- Günzel D., Yu A.S. (2013):** Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 93(2): 525-569.
- Gurney K.J., Estrada E.Y., Rosenberg G.A. (2006):** Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis.* 23(1): 87-96.
- Harhaj N.S., Felinski E.A., Wolpert E.B., Sundstrom J.M., Gardner T.W., Antonetti D.A. (2006):** VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47: 5106-5115.
- Harris H.J., Davis C., Mullins J.G.L., Hu K., Goodall M., Farquhar M.J., Mee C.J., McCaffrey K., Young S., Drummer H., Balfe P., McKeating J.A. (2010):** Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem.* 285: 21092-21102.
- Hartmann G., Tschöp M., Fischer R., Bidlingmaier C., Riepl R., Tschöp K., Hautmann H., Endres S., Toepfer M. (2000):** High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine* 12(3): 246-252.
- Hartsock H., Nelson W.J. (2008):** Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778(3): 660-669.

- Hashimoto K., Oshima T., Tomita T., Kim Y., Matsumoto T., Joh T., Miwa H. (2008):** Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 376: 154-157.
- Haskins J., Gu L., Wittchen E.S., Hibbard J., Stevenson B.R. (1998):** ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol.* 141(1): 199-208.
- Hawkins B.T., Davis T.P. (2005):** The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57(2): 173-185.
- Hirase T., Kawashima S., Wong E.Y., Ueyama T., Rikitake Y., Tsukita S., Yokoyama M., Staddon J.M. (2001):** Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 276(13): 10423-10431.
- Hou, J., Paul D.L., Goodenough D.A (2005):** Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci.* 118: 5109-5118.
- Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., Tsukita S. (2005):** Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171(6): 939-945.
- Ikenouchi J., Umeda K., Tsukita S., Furuse M., Tsukita, S. (2007):** Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol.* 176(6): 779-786.
- Ikenouchi J., Sasaki H., Tsukita S., Furuse M., Tsukita S. (2008):** Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19: 4687-4693.
- Ingall T. (2004):** Stroke-incidence, mortality, morbidity and risk. *J Insur Med.* 36(2): 143-152.
- Islas S., Vega J., Ponce L., Gonzalez-Mariscal L. (2002):** Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res.* 274(1): 138-148.
- Itoh M., Furuse M., Morita K., Kubota K., Saitou M., Tsukita S. (1999):** Direct Binding of Three Tight Junction-Associated Maguks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the CooH Termini of Claudins. *J Cell Biol.* 147(6): 1351-1363.
- Itoh M., Sasaki H., Furuse M., Ozaki H., Kita T., Tsukita S. (2001):** Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol.* 154(3): 491-497.
- Ivanov A.I., Nusrat A., Parkos C.A. (2004):** Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 15: 176-188.
- Jamaluddin M.S., Lin P.H., Yao Q.Z., Chen C.Y. (2010):** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 208: 104-111.

- Jiang S., Moriarty-Craige S.E., Orr M., Cai J., Sternberg P., Jones D.P. Jr (2005):** Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: dependence on extracellular redox state. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(3): 1054-1061.
- John L.J., Fromm M., Schulzke J.D. (2011):** Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 15: 1255-1270.
- Karpova, T.S., Baumann C.T., He L., Wu X., Grammer A., Lipsky P., Hager G.L., McNally J.G. (2003):** Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc.* 209: 56-70.
- Kim Y.A., Park S.L., Kim M.Y., Lee S.H., Baik E.J., Moon C.H., Jung Y.S. (2010):** Role of PKC beta II and PKC delta in blood-brain barrier permeability during aglycemic hypoxia. *Neurosci Lett.* 468: 254-258.
- Kitajiri S.I., Furuse M., Morita K., Saishin-Kiuchi Y., Kido H., Ito J., Tsukita S. (2004):** Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res.* 187: 25-34.
- Klausner R.D., Donaldson J.G., Lippincott-Schwartz J. (1992):** Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffick and organelle structure. *J Cell Biol.* 116: 1071-1080.
- Kominsky S.L., Argani P., Korz D., Evron E., Raman V., Garrett E., Rein A., Sauter G., Kallioniemi O.P., Sukumar S. (2003):** Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22: 2021-2033.
- Kominsky S.L., Vali M., Korz D., Gabig T.G., Weitzman S.A., Argani P., Sukumar S. (2004):** *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol.* 164: 1627-1633.
- König J., Galliardt H., Jütte P., Schäper S., Dittmann L., Dietz K.J. (2013):** The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *Exp Bot.* 64(11): 3483-3497.
- Krause G., Winkler L., Müller S.L., Haseloff R.F., Piontek J., Blasig I.E. (2008):** Structure and functions of claudins. *Biochem Biophys Acta* 1778: 631-645.
- Krizbai I.A., Lenzser G., Szatmari E., Farkas A.E., Wilhelm I., Fekete Z., Erdos B., Bauer H., Bauer H.C., Sandor P., Komjati K. (2005a):** Blood-brain barrier changes during compensated and decompensated hemorrhagic shock. *Shock* 24: 428-433.
- Krizbai I.A., Bauer H., Bresgen N., Eckl P.M., Farkas A., Szatmari E., Traweger A., Wejksza K., Bauer H.C. (2005b):** Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 25: 129-139.
- Krug S.M., Amasheh S., Richter J.F., Milatz S., Günzel D., Westphal J.K., Huber O., Schulzke J.D., Fromm M. (2009):** Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 20: 3713-3724.

Kucharzik T., Walsh S.V., Chen J., Parkos C.A., Nusrat A. (2001): Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* 159: 2001-2009.

Kuhlmann C.R.W., Tamaki R., Gamerding M., Lessmann V., Behl C., Kempfski O.S., Luhmann H.J. (2007): Inhibition of the myosin light chain kinase prevents hypoxia-induced blood-brain barrier disruption. *J Neurochem.* 102(2): 501-507.

Kuwabara H., Kokai Y., Kojima T., Takakuwa R., Mori M., Sawada N. (2001): Occludin regulates actin cytoskeleton in endothelial cells. *Cell Struct Funct.* 26: 109-116.

Lacaz-Vieira F., Jaeger M.M., Farshori P., Kachar B. (1999): Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. *J Membr Biol.* 168(3): 289-297.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lambert D., O'Neill C.A., Padfield P.J. (2005): Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem J.* 387: 553-560.

Lange S., Sylvester M., Schümann M., Freund C., Krause E. (2010): Identification of Phosphorylation-Dependent Interaction Partners of the Adapter Protein ADAP using Quantitative Mass Spectrometry: SILAC vs ¹⁸O-Labeling. *J Proteome Res.* 9(8): 4113-4122.

Lassiter C., Fan X., Joshi P.C., Jacob B.A., Sutliff R.L., Jones D.P., Koval M., Guidot D.M. (2009): HIV-1 transgene expression in rats causes oxidant stress and alveolar epithelial barrier dysfunction. *AIDS Res Ther.* 6: 1.

Li D., Mrsny R.J. (2000): Oncogenic Raf-1 Disrupts Epithelial Tight Junctions via Downregulation of Occludin. *J Cell Biol.* 148(4): 791-800.

Li Y.H., Fanning A.S., Anderson J.M., Lavie A. (2005): Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: Identification of the ZO-1 binding surface. *J Mol Biol.* 352: 151-164.

Li Q.R., Zhang Q., Wang C.Y., Liu X.X., Qu L.L., Gu L.L., Li N., Li J.S. (2009): Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Cell Mol Med.* 13: 4061-4076.

Li J., Angelow S., Linge A., Zhuo M., Yu A.S. (2013): Claudin-2 pore function requires an intramolecular disulfide bond between two conserved extracellular cysteines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 305(2): C190-196.

Liebner, S., Fischmann A., Rascher G., Duffner F., Grote E.H., Kalbacher H., Wolburg H. (2000): Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 100: 323-331.

- Liu Y., Nusrat A., Schnell F.J., Reaves T.A., Walsh S., Pochet M., Parkos C.A. (2000):** Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 113(13): 2363-2374.
- Liu W.L., Sood R., Chen Q.C., Sakoglu U., Hendren J., Cetin O., Miyake M., Liu K.J. (2008):** Normobaric hyperoxia inhibits NADPH oxidase-mediated matrix metalloproteinase-9 induction in cerebral microvessels in experimental stroke. *J Neurochem.* 107: 1196-1205.
- Liu W., Hendren J., Qin X.J., Shen J., Liu K.J. (2009):** Normobaric hyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 108: 811-820.
- Lochhead J.J., McCaffrey G., Quigley C.E., Finch J., DeMarco K.M., Nametz N., Davis T.P. (2010):** Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(9): 1625-1636.
- Loqman M.Y., Bush P.G., Farquharson C., Hall A.C. (2010):** A cell shrinkage artefact in growth plate chondrocytes with common fixative solutions: importance of fixative osmolarity for maintaining morphology. *Eur Cell Mater.* 19: 214-227.
- Lu S.C. (2009):** Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 30(1-2): 42-59.
- Luo Y., Fukuhara M., Zhou Y., Rahner C., Rizzolo L. (2005):** Growth Conditions Affect the Formation of Tight Junctions in ARPE-19 Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: E-3034.
- Lynch R.D., Francis S.A., McCarthy K.M., Casas E., Thiele C., Schneeberger E.E. (2007):** Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Exp Cell Res.* 313(12): 2597-2610.
- Mack A.F., Wolburg H. (2006):** Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. *Brain Res.* 1103: 25-31.
- Mandel L.J., Bacallao R., Zampighi, G. (1993):** Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* 361(6412): 552-555.
- Mandell K.J., Babbitt B.A., Nusrat A., Parkos C.A. (2005):** Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity. *J Biol Chem.* 280(12): 11665-11674.
- Mankertz J., Waller J.S., Hillenbrand B., Tavalali S., Florian P., Schöneberg T., Fromm M., Schulzke J.D. (2002):** Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Co.* 298: 657-666.
- Mannino D.M. (2002):** COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 121(5 Suppl): 121S-126S.
- Maraldi T., Prata C., Caliceti C., Vieceli Dalla Sega F., Zambonin L., Fiorentini D., Hakim G. (2010):** VEGF-induced ROS generation from NAD(P)H oxidases protects human leukemic cells from apoptosis. *Int J Oncol.* 36(6): 1581-1589.

Mark K.S., Davis T.P. (2002): Cerebral microvascular changes in permeability and TJ induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 82: H1485-1494.

Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E. (1998): Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142(1): 117-127.

Matter K., Balda M.S. (1998): Biogenesis of tight junctions the C-terminal domain of occludin mediates basolateral targeting. *J Cell Sci.* 111: 511-519.

McCaffrey G., Seelbach M.J., Staatz W.D., Nametz N., Quigley C., Campos C.R., Brooks T.A., Davis T.P. (2008): Occludin oligomeric assembly at TJ of the BBB is disrupted by peripheral inflammatory hyperalgesia. *J Neurochem.* 106: 2395-2409.

McCarthy K.M., Skare I.B., Stankewich M.C., Furuse M., Tsukita S., Rogers R.A., Lynch R.D., Schneeberger E.E. (1996): Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci.* 109(9): 2287-2298.

McDermott J.R., Bartram R.E., Knight P.A., Miller H.R.P., Garrod D.R., Grecis R.K. (2003): Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 7761-7766.

McNamara B.P., Koutsouris A., O'Connell C.B., Nougayrede J.P., Donnenberg M.S., Hecht G. (2001): Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest.* 107: 621-629.

Medina R., Rahner C., Mitic L.L., Anderson J.M., Van Itallie C.M. (2000): Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol.* 178(3): 235-247.

Minagar A., Ostanin D., Long A.C., Jennings M., Kelley R.E., Sasaki M., Alexander J.S. (2003): Serum from patients with multiple sclerosis downregulates occludin and VE-cadherin expression in cultured endothelial cells. *Mult Scler.* 9: 235-238.

Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K., Tamura A., Igarashi M., Endo T., Takeuchi K., Tsukita S. (2011): Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585: 606-612.

Mitic L.L., Schneeberger E.E., Fanning A.S., Anderson J.M. (1999): Connexin-occludin chimeras containing the ZO-binding domain of occludin localize at MDCK tight junctions and NRK cell contacts. *J Cell Biol.* 146: 683-693.

Miwa N., Furuse M., Tsukita S., Niikawa N., Nakamura Y., Furukawa Y. (2001): Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res.* 12: 469-476.

Moore L.G., Harrison G.L., McCullough R.E., McCullough R.G., Micco A.J., Tucker A., Weil J.V., Reeves J.T. (1985): Low acute hypoxic ventilatory response and hypoxic depression in acute altitude sickness. *J Appl Physiol.* 60(4): 1407-1412.

- Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S. (1999):** Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 147(1): 185-194.
- Müller S.L., Portwich M., Schmidt A., Utepbergenov D.I., Huber O., Blasig I.E., Krause G. (2005):** The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem.* 280(5): 3747-3756.
- Mullin J.M. (2004):** Epithelial Barriers, Compartmentation, and Cancer. *Sci STKE* pe2.
- Mullin J.M., Agostino N., Rendon-Huerta E., Thornton J.J. (2005):** Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today* 10: 395-408.
- Murakami T., Felinski E.A., Antonetti D.A. (2009):** Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem.* 284: 21036-21046.
- Murdoch C., Muthana M., Lewis C.E. (2005):** Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation. *J Immunol.* 175(10): 6257-6263.
- Muresan Z., Paul D.L., Goodenough D.A. (2000):** Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 11(2): 627-634.
- Nagahara N. (2011):** Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch. *Amino Acids* 41(1): 59-72.
- Naji A., Levine A.J., Pincus P.A. (2007):** Corrections to the Saffman-Delbrück Mobility for Membrane Bound Proteins. *Biophys J.* 93(11): L49-L51.
- Nakatsukasa M., Kawasaki S., Yamasaki K., Fukuoka H., Matsuda A., Tsujikawa M., Tanioka H., Nagata-Takaoka M., Hamuro J., Kinoshita S. (2010):** Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Pathol.* 177(3): 1344-1355.
- Nazli A., Chan O., Dobson-Belaire W.N., Ouellet M., Tremblay M.J., Gray-Owen S.D., Arsenaault A.L., Kaushic C. (2010):** Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* 6: 23-27.
- Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S. (2003):** Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161(3): 653-660.
- Nunbhakdi-Craig V., Machleidt T., Ogris E., Bellotto D., White C.L. 3rd, Sontag E. (2002):** Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol.* 158(5): 967-978.
- Nunbhakdi-Craig V., Craig L., Machleidt T., Sontag E. (2003):** Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol.* 77: 2807-2818.

- Nusrat A., Chen J.A., Foley C.S., Liang T.W., Tom J., Cromwell M., Quan C., Mrsny, R. J. (2000):** The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem.* 275(38): 29816-29822.
- Nusrat A., von Eichel-Streiber C., Turner J.R., Verkade P., Madara J.L., Parkos C.A. (2001):** *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun.* 69: 1329-1336.
- Nusrat, A., Brown G.T., Tom J., Drake A., Bui T.T., Quan C., Mrsny R.J. (2005):** Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 16(4): 1725-1734.
- Olsen, O., Brecht D.S. (2003):** Functional analysis of the nucleotide binding domain of membrane-associated guanylate kinases. *J Biol Chem.* 278(9): 6873-6878.
- Park J.H., Okayama N., Gute D., Krsmanovic A., Battarbee H., Alexander J.S. (1999):** Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol.* 277: C1066-C1074.
- Parsell D.A., Silber K.R., Sauer R.T. (1990):** Carboxy-terminal determinants of intracellular protein degradation. *Genes Dev.* 4(2): 277-286.
- Pelis R.M., Dangprapai Y., Cheng Y., Zhang X., Terpstra J., Wright S.H. (2012):** Functional significance of conserved cysteines in the human organic cation transporter 2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 303(2): F313-320.
- Peng B.H., Lee J.C., Campbell G.A. (2003):** In vitro protein complex formation with cytoskeleton-anchoring domain of occludin identified by limited proteolysis. *J Biol Chem.* 278: 49644-49651.
- Peng Z.M., Geh E., Chen L., Meng Q.H., Fan Y.X., Sartor M., Shertzer H.G., Liu Z.G., Puga A., Xia Y. (2010):** Inhibitor of kappa B kinase beta regulates redox homeostasis by controlling the constitutive levels of glutathione. *Mol Pharmacol.* 77: 784-792.
- Piontek J., Winkler L., Wolburg H., Müller S.L., Zuleger N., Piehl C., Wiesner B., Krause G., Blasig I.E. (2008).** Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22: 146-158.
- Piontek J., Fritzsche S., Cording J., Richter S., Hartwig J., Walter M., Yu D., Turner J.D., Gehring C., Rahn H-P., Wolburg H., Blasig I.E. (2011):** Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci.* 68: 3903-3918.
- Pluemsampant S., Safronova O.S., Nakahama K., Morita I. (2008):** Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *Int J Cancer* 122(2): 333-341.
- Poo M.M., Cone R.A. (1973):** Lateral diffusion of phodopsin in Necturus rods. *Exp Eye Res.* 17: 503-514.
- Powell, D.W. (1981):** Barrier function of epithelia. *Am J Physiol.* 241: G275-G288.

- Proia P., Schiera G., Salemi G., Ragonese P., Savettieri G., Di Liegro I. (2009):** Neuronal and BBB damage induced by sera from patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Int J Mol Med.* 24: 743-747.
- Prota, A.E., Campbell J.A., Schelling P., Forrest J.C., Watson M.J., Peters T.R., Aurrand-Lions M., Imhof B.A., Dermody T.S., Stehle T. (2003):** Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 5366-5371.
- Qian, H., Sheetz M.P., Elson E. (1991):** Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J.* 60: 910-921.
- Radi R. (2013):** Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res.* 46(2): 550-559.
- Rahner C., Mitic L.L., Anderson J.M. (2001):** Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120: 411-422.
- Raikwar N.S., Vandewalle A., Thomas C.P. (2010):** Nedd4-2 interacts with occludin to inhibit tight junction formation and enhance paracellular conductance in collecting duct epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299: F436-444.
- Raimondi F., Santoro P., Barone M.V., Pappacoda S., Barretta M.L., Nanayakkara M., Apicella C., Capasso L., Paludetto R. (2008):** Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294: G906-G913.
- Raina S.A., Tsai J., Samsó M., Fessenden J.D. (2012):** FRET-Based Localization of Fluorescent Protein Insertions Within the Ryanodine Receptor Type 1. *PLoS ONE* 7(6): e38594.
- Rajasekaran S.A., Barwe S.P., Gopal J., Ryazantsev S., Schneeberger E.E., Rajasekaran A.K. (2007):** Na-K-ATPase regulates tight junction permeability through occludin phosphorylation in pancreatic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 292: G124-G133.
- Raleigh D.R., Marchiando A.M., Zhang Y., Shen L., Sasaki H., Wang Y.M., Long M.Y., Turner J.R. (2010):** Tight junction-associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* 21: 1200-1213.
- Raleigh D.R., Boe D.M., Yu D., Weber C.R., Marchiando A.M., Bradford E.M., Wang Y., Wu L., Schneeberger E.E., Shen L., Turner J.R. (2011):** Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *J Cell Biol.* 193: 565-582.
- Ramadan J.W., Steiner S.R., O'Neill C.M., Nunemaker C.S. (2011):** The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. *Cell Calcium* 50(6): 481-490.

- Rao R. (2009):** Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann NY Acad Sci.* 1165: 62-68.
- Rentea R.M., Liedel J.L., Welak S.R., Cassidy L.D., Mayer A.N., Pritchard K.A. Jr, Oldham K.T., Gourlay D.M. (2012):** Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 47: 1135-1142.
- Riazuddin, S., Ahmed Z.M., Fanning A.S., Lagziel A., Kitajiri S., Ramzan K., Khan S. N., Chattaraj P., Friedman P.L., Anderson J.M., Belyantseva I.A., Forge A., Riazuddin S., Friedman T.B. (2006):** Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet.* 79(6): 1040-1051.
- Rosenberg G.A., Yang Y. (2007):** Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* 22(5): 1-9.
- Roxas J.L., Koutsouris A., Bellmeyer A., Tesfay S., Royan S., Falzari K., Harris A., Cheng H., Rhee K.J., Hecht G. (2010):** Enterohemorrhagic *E. coli* alters murine intestinal epithelial tight junction protein expression and barrier function in Shiga toxin independent manner. *Lab Invest.* 90: 1152-1168.
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y. (2010) : I-TASSER :** A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 5: 725-738.
- Ruffer, C., Gerke, V. (2004):** The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol.* 83(4): 135-144.
- Saenz-Morales D., Conde E., Escribese M.M., Garcia-Martos M., Alegre L., Blanco-Sanchez I., Garcia-Bermejo M.L. (2009):** ERK1/2 mediates cytoskeleton and focal adhesion impairment in proximal epithelial cells after renal ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 23: 285-294.
- Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T. und Tsukita S. (1998):** Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 141(2): 397-408.
- Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J.D., Fromm M., Takano H., Noda T., Tsukita, S. (2000):** Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11(12): 4131-4142.
- Sakakibara A., Furuse M., Saitou M., Ando-Akatsuka Y., Tsukita, S. (1997):** Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 137(6): 1393-1401.
- Sallee J.L. (2009):** Density-enhanced Phosphatase 1 Regulates Phosphorylation of Tight Junction Proteins and Enhances Barrier Function of Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 284(22): 14997-15006.

Sanchez-Pulido L., Martin-Belmonte F., Valencia A., Alonso M.A. (2002): MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci.* 27: 599-601.

Sasaki, H., Matsui C., Furuse K., Mimori-Kiyosue Y., Furuse M., Tsukita S. (2003): Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 3971-3976.

Schiedel A.C., Hinz S., Thimm D., Sherbiny F., Borrmann T., Maass A., Müller C.E. (2011): The four cysteine residues in the second extracellular loop of the human adenosine A2B receptor: role in ligand binding and receptor function. *Biochem Pharmacol.* 82(4): 389-399.

Schmitt M., Klonowski-Stumpe H., Eckert M., Luthen R., Haussinger D. (2004): Disruption of paracellular sealing is an early event in acute caerulein-pancreatitis. *Pancreas* 28: 181-190.

Schoch H.J., Fischer S., Marti H.H. (2002): Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 125(11): 2549-2557.

Schulzke J.D., Ploeger S., Amasheh M., Fromm A., Zeissig S., Troeger H., Richter J., Bojarski C., Schumann M., Fromm M. (2009): Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1165: 294-300.

Seth A., Sheth P., Elias B.C., Rao R. (2007): Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *J Biol Chem.* 282: 11487-11498.

Severson E.A., Kwon M., Hilgarth R.S., Parkos C.A., Nusrat A. (2010): Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 397(3): 592-597.

Sheehan, G.M., Kallakury B.V., Sheehan C.E., Fisher H.A., Kaufman R.P. Jr., Ross J.S. (2007): Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 38: 564-569.

Shen L., Weber C.R., Turner J.R. (2008): The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol.* 181(4): 683-695.

Sheth P., Basuroy S., Li C., Naren A.P., Rao R.K. (2003): Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J Biol Chem.* 278(49): 49239-49245.

Sheth P., Samak G., Shull J.A., Seth A., Rao R. (2009): Protein phosphatase 2A plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *Biochem J.* 421: 59-70.

Simon D.B., Lu Y., Choate K.A., Velazquez H., Al Sabban E., Praga M., Casari G., Bettinelli A., Colussi G., Rodriguez-Soriano J., McCredie D., Milford D., Sanjad S., Lifton R.P. (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285(5424): 103-106.

Singh A.B., Sharma A., Dhawan P. (2010): Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. *J Oncology* Volume 2010, Article ID 541957.

Smales C., Ellis M., Baumber R., Hussain N., Desmond H., Staddon J.M. (2003): Occludin phosphorylation: identification of an occludin kinase in brain and cell extracts as CK2. *FEBS Lett.* 545: 161-166.

Söderberg O., Gullberg M., Jarvius M., Ridderstråle K., Leuchowius K.J., Jarvius J., Wester K., Hydbring P., Bahram F., Larsson L.G., Landegren U. (2006): Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3(12): 995-1000.

Souza J.M., Daikhin E., Yudkoff M., Raman C.S. and Ischiropoulos H. (1999): Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys.* 371: 169-178.

Spring, K.R. (1998): Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. *Annu Rev Physiol.* 60: 105-119.

Stahelin, L.A. (1973): Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci.* 13: 763-786.

St-Denis N.A., Litchfield D.W. (2009): Protein kinase CK2 in health and disease: from birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol Life Sci.* 66: 1817-1829.

Steed E., Rodrigues N.T.L., Balda M.S., Matter K. (2009): Identification of marvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.* 10: 371-379.

Stehbens W.E. (2004): Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol.* 77: 121-132.

Stevenson B.R., Siliciano J.D., Mooseker M.S., Goodenough D.A. (1986): Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 103(3): 755-766.

Storjohann L., Holst B., Schwartz T.W. (2008): A second disulfide bridge from the N-terminal domain to extracellular loop 2 dampens receptor activity in GPR39. *Biochemistry* 47: 9198-9207.

Sundstrom J.M., Tash B.R., Murakami T., Flanagan J.M., Bewley M.C., Stanley B.A., Gonsar K.B., Antonetti D.A. (2009): Identification and analysis of occludin phosphosites: a combined mass spectrometry and bioinformatics approach. *J Proteome Res.* 8: 808-817.

Suzuki K., Kokai Y., Sawada N., Takakuwa R., Kuwahara K., Isogai E., Isogai H., Mori M. (2002): SS1 *Helicobacter pylori* disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice. *Virchows Arch.* 440: 318-324.

Suzuki T., Elias B.C., Seth A., Shen L., Turner J.R., Giorgianni F., Desiderio D., Guntaka R., Rao R. (2009): PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 106: 61-66.

- Talavera D., Castillo A.M., Dominguez M.C., Gutierrez A.E., Meza I. (2004):** IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol.* 85: 1801-1813.
- Tash B.R., Bewley M.C., Russo M., Keil J.M., Griffin K.A., Sundstrom J.M., Antonetti D.A., Tian F., Flanagan J.M. (2012):** The occludin and ZO-1 complex, defined by small angle X-ray scattering and NMR, has implications for modulating tight junction permeability. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109: 10855-10860.
- Tavelin S., Hashimoto K., Malkinson J., Lazorova L., Toth I., and Artursson P. (2003):** A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides. *Mol Pharmacol.* 64: 1530-1540.
- Tobioka H., Isomura H., Kokai Y., Tokunaga Y., Yamaguchi J., Sawada N. (2004):** Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 35: 159-164.
- Tomko R.P., Xu R., Philipson L. (1997):** HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94(7): 3352-3356.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2010):** *Microbiology: An Introduction.* San Francisco: Benjamin Cummings. pp. 616–618. ISBN 0-321-55007-2.
- Traweger A., Fang D., Liu Y-C, Stelzhammer W., Krizbai I.A., Fresser F., Bauer H.-C., and Bauer H. (2002):** The Tight Junction-specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch. *J Bio Chem.* 277(12): 10201-10208.
- Traweger A., Fuchs R., Krizbai I.A., Weiger T.M., Bauer H.C., Bauer H. (2003):** The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem.* 278(4): 2692-2700.
- Trembley J.H., Wang G., Unger G., Slaton J., Ahmed K. (2009):** CK2: A key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci.* 66: 1858-1867.
- Tsien R.Y. (1998):** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67: 509-544.
- Tsukita S., Furuse M. (1999):** Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* 9: 268-273.
- Tsukita S., Yamazaki Y., Katsuno T., Tamura A., Tsukita S. (2008):** Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27: 6930-6938.
- Turksen, K., Troy T.C. (2001):** Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn.* 222: 292-300.
- Umeda K., Ikenouchi J., Katahira-Tayama S., Furuse K., Sasaki H., Nakayama M., Matsui T., Tsukita S., Furuse M., Tsukita S. (2006):** ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126: 741-754.

- Unger, V.M., Kumar N.M., Gilula N.B., Yeager M. (1999):** Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283:1176-1180.
- Utech M., Ivanov A.I., Samarin S.N., Bruewer M., Turner J.R., Mrsny R.J., Parkos C.A., Nusrat A. (2005):** Mechanism of IFN γ - induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 16: 5040-5052.
- Van Itallie, C.M., Anderson J.M. (2006):** Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 68: 403-429.
- Van Itallie C.M., Fanning A.S., Bridges A., Anderson J.M. (2009):** ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 20: 3930-3940.
- Van Itallie C.M., Fanning A.S., Holmes J., Anderson J.M. (2010):** Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci.* 123(16): 2844-2852.
- Van Itallie C.M., Mitic L.L., Anderson J.M. (2011):** Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J Biol Chem.* 286: 3442-3450.
- Vietor I., Bader T., Paiha K., Huber L.A. (2001):** Perturbation of the tight junction permeability barrier by occludin loop peptides activates beta-catenin/TCF/LEF-mediated transcription. *EMBO Rep.* 2: 306-312.
- Vliet A.v.d., Eiserich J.P., O'Neill C.A., Halliwell B., Cross C.E. (1995):** Tyrosine Modification by reactive nitrogen species: A closer look. *Arch Biochem Biophys.* 319(2): 341-349.
- Vovis, G.F., Lacks S. (1977):** Complementary action of restriction enzymes Endo R. *DpnI* and Endo R. *DpnII* on bacteriophage ϕ 1 DNA. *J Mol Biol.* 115: 525-538.
- Wakiyama M., Sakai N., Kojima S., Miura K. (1997):** Disulfide bond formation is not involved in cap-binding activity of Xenopus translation initiation factor eIF-4E. *FEBS Lett.* 409(3): 407-410.
- Walter J.K., Rueckert C., Voss M., Mueller S.L., Piontek J., Gast K., Blasig, I.E. (2009):** The Oligomerization of the Coiled Coil-domain of Occludin Is Redox Sensitive. In *Molecular Structure and Function of the Tight Junction: From Basic Mechanisms to Clinical Manifestations*, vol. 1165 (eds M. Fromm and J. D. Schulzke), pp. 19-27.
- Walter M. (2010):** Charakterisierung des Tight Junction Proteins Claudin-12. Praxisbericht.
- Wan H., Winton H.L., Soeller C., Tovey E.R., Gruenert D.C., Thompson P.J., Stewart G.A., Taylor G.W., Garrod D.R., Cannell M.B., Robinson C. (1999):** Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest.* 104: 123-133.
- Wan H., Winton H.L., Soeller C., Taylor G.W., Gruenert D.C., Thompson P.J., Cannell M.B., Stewart G.A., Garrod D.R., Robinson C. (2001):** The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of Dermatophagoides pteronyssinus. *Clin Exp Allergy* 31: 279-294.

Wan O.W., Chung K.K. (2012): The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS One* 7(6): e38545.

Wang W., Dentler W.L., Borchardt R.T. (2001): VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H434-H440.

Wang Z.L., Mandell K.J., Parkos C.A., Mrsny R.J., and Nusrat A. (2005): The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* 24: 4412-4420.

Wang P., Wu Y., Li X., Ma X., Zhong L. (2013): Thioredoxin and thioredoxin reductase control tissue factor activity by thiol redox-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 288: 3346-3358.

Wen, H., Watry D.D., Marcondes M.C., Fox H.S. (2004): Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol.* 24: 8408-8417.

Westphal J.K., Dörfel M.J., Krug S.M., Cording J.D., Piontek J., Blasig I.E., Tauber R., Fromm M., Huber O. (2010): Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol Life Sci.* 67: 2057-2068.

Witt K.A., Mark K.S., Hom S., Davis T.P. (2003): Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Phys.* 285: H2820-H2831.

Wittchen E.S., Haskins J., Stevenson B.R. (1999): Protein interactions at the tight junction: actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem.* 274: 35179-35185.

Wolburg, H., Neuhaus J., Kniesel U., Krauss B., Schmid E.M., Ocalan M., Farrell C., Risau W. (1994): Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci.* 107(5): 1347-1357.

Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Kraus J., Rascher-Eggstein G., Liebner S., Hamm S., Duffner F., Grote E.H., Risau W., Engelhardt B. (2003): Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 105(6): 586-592.

Wong V., Gumbiner B.M. (1997): A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol.* 136(2): 399-409.

Wouters F.S., Bastiaens P.I., Wirtz K.W., Jovin T.M. (1998): FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *EMBO J.* 17: 7179-7189.

Wu Z.Y., Nybom P., Magnusson K.E. (2000): Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2: 11-17.

Wu F., Wilson J.X. (2009): Peroxynitrite-dependent activation of protein phosphatase type 2A mediates microvascular endothelial barrier dysfunction. *Cardiovasc Res.* 81: 38-45.

Yaffe Y., Shepshelovitch J., Nevo-Yassaf I., Yeheskel A., Shmerling H., Kwiatek J. M., Gaus K., Pasmanik-Chor M., Hirschberg K. (2012): The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *J Cell Sci.* 125: 3545-3556.

Yamagata K., Tagami M., Takenaga F., Yamori Y., Itoh S. (2004): Hypoxia-induced changes in tight junction permeability of brain capillary endothelial cells are associated with IL-1beta and nitric oxide. *Neurobiol Dis.* 17(3): 491-509.

Yamamoto T., Saeki Y., Kurasawa M., Kuroda S., Arase S., Sasaki H. (2008): Effect of RNA interference of tight junction related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 300: 517-524.

Yamamoto M., Ramirez S.H., Sato S., Kiyota T., Cerny R.L., Kaibuchi K., Persidsky Y., Ikezu T. (2008): Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *Am J Pathol.* 172(2): 521-533.

Yang D., Elner S.G., Bian Z.M., Till G.O., Petty H.R., Elner V.M. (2007): Pro inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp Eye Res.* 85(4): 462-472.

Yeh W.L., Lu D.Y., Lin C.J., Liou H.C., Fu W.M. (2007): Inhibition of Hypoxia-Induced Increase of Blood-Brain Barrier Permeability by YC-1 through the Antagonism of HIF-1 α Accumulation and VEGF Expression. *Mol Pharmacol.* 72(2): 440-449.

Yeo W.S., Lee S.J., Lee J.R., Kim K.P. (2008): Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Reports* 41(3): 194-203.

Yu A.S.L., McCarthy K.M., Francis S.A., McCormack J.M., Lai J., Rogers R.A., Lynch R.D., Schneeberger E.E. (2005): Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288: C1231-C1241.

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

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

Zheng X., Ying L., Liu J., Dou D., He Q., Leung S.W.S., Man R.Y.K., Vanhoutte P.M., Gao Y. (2011): Role of sulfhydryl-dependent dimerization of soluble guanylyl cyclase in relaxation of porcine coronary artery to nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 90(3): 565-572.

Zhong Z.H., Deane R., Ali Z., Parisi M., Shapovalov Y., O'Banion M.K., Stojanovic K., Sagare A., Boillee S., Cleveland D.W., Zlokovic B.V. (2008): ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci.* 11: 420-422.

Zhu Y., Brannstrom M., Janson P.O., Sundfeldt K. (2006): Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *Int J Cancer* 118: 1884-1891.

8. Verzeichnis eigener Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit sind in den folgenden Publikationen enthalten:

Bellmann C., Schreivogel S., Günther R., Dabrowski S., Schümann M., Wolburg H., Blasig I.E. (2013): Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin – redox dependency of the second extracellular loop. *Antiox Redox Signal.*; in press

Dörfel M.J., Westphal J.K., Bellmann C., Krug S.M., Cording J., Mittag S., Tauber R., Fromm M., Blasig I.E., Huber O. (2013): CK2-dependent phosphorylation of occludin regulates the interaction with ZO-proteins and tight junction integrity. *Cell Commun Signal.* 11: 40.

Weitere Publikationen:

Cording J., Berg J., Käding N., Bellmann C., Westphal J.K., Milatz S., Günzel D., Wolburg H., Piontek J., Huber O., Blasig I.E. (2013): Tight Junctions: claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci.* 162: 554-564.

Dabrowski S., Staat C., Zwanziger D., Sauer R.S., Bellmann C., Günther R., Krause I., Haseloff R.H., Rittner H., Blasig I.E. (2014): Redox dependent structure and function of the first extracellular loop of the tight junction protein claudin-1-lessons from molecular structure to animal. Eingereicht bei *Antiox Redox Signal.*

Blasig I.E., Bellmann C., Cording J., del Vecchio G., Zwanziger D., Huber O., Haseloff R.F. (2011): Occludin Protein Family: Oxidative Stress and Reducing Conditions. *Antiox Redox Signal.*; 15(5): 1195-1219.

Posterbeiträge zu wissenschaftlichen Konferenzen:

Bellmann C., Schreivogel S., Blasig I.E.

The role of conserved cysteines in the cis- and trans- homooligomerization of occludin under oxidative stress.

Konferenz: Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia. Merida, Mexico, November, 2012

Bellmann C., Castro V., Krug S., Fromm M., Blasig I.E.

The dimerization of occludin is a precondition for the redox sensitive interplay between occludin and ZO-1 and constitutes a novel tight junctionregulatory mechanism.

9th International Conference on Cerebral Vascular Biology, Leiden, Niederlande, Juni 2011.

Victor Castro, Christian Bellmann, Ingolf E. Blasig

The C-terminal domain of occludin is a key regulatory element of the tight junctions in the blood brain barrier

Campus Berlin-Buch Symposium, Deutschland, Mai 2011

Victor Castro, Christian Bellmann, Susanne Krug, Michael Fromm, Ingolf E. Blasig

The occludin/ZO-1 interplay evidences a novel TJ regulatory mechanism based on the redox sensitivity of occludin dimerization.

13th international symposium of signal Transduction in the blood brain barrier. Zürich, Schweiz, September 2010.

Victor Castro, Christian Bellmann, Susanne Krug, Michael Fromm, Ingolf E. Blasig

Occludin forms a disulfide bridge in order to dimerize and recruit ZO-1 to the cell membrane. Life under reconstruction. Berlin, Deutschland, Mai 2010.

Victor Castro, Christian Bellmann, Jörg Piontek, Ingolf E. Blasig

Disulfide bridge mediated occludin dimerization

12th international Symposium of signal transduction in the blood brain barrier. London, England, September 2009.

Preise:

Best Poster (9th International Conference on Cerebral Vascular Biology, Leiden, Niederlande) Juni 2011.

Vorträge auf wissenschaftlichen Konferenzen:

The role of conserved cysteines in the *cis*- and *trans*- homooligomerization of occludin under oxidative stress.

Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia. Merida, Mexico, November, 2012.

The role of conserved cysteines in the *cis*- and *trans*- homooligomerization of occludin under oxidative stress.

15th International Symposium Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers Potsdam, Deutschland, September, 2012.

Rolle der Cysteine bei der Oligomerisation von Occludin

14. Bad Herrenalber Transporter- und Barrieretage
Bad Herrenalb, Deutschland, Mai 2012.

The role of transmembranous cysteines in the *cis*- and *trans*- homooligomerization of occludin under oxidative stress.

PhD Symposium Campus Berlin-Buch, Deutschland, Mai 2011.

Rolle der Cysteine bei der Oligomerisation von Occludin

Tight Junction Day. FOR-721/5-Molecular Structure and Function of the Tight Junction
Berlin, Campus Benjamin Franklin, Deutschland, September 2010.

9. Lebenslauf

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

10. Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterzeichnung erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den von mir im Verzeichnis aufgeführten Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 17.12.2013

Christian Bellmann

11. Appendix

Mensch/1-522	1MSSRPLESPPPYRPDEFKPNHYPSNDIYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	136
Orang-Utan/1-522	1MSSRPLESPPPYRPDEFKPNHYPSNDIYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	136
Schwein/1-522	1MSSRPLESPPPYRPDEFKPNHYPSNDIYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	136
Hund/1-521	1MSSRPFESPPPYRPDEFKPNHYPSNDVYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	137
Rind/1-522	1MSSRPFESPPPYRPDEFKPNHYPSNDIYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	138
Ratte/1-523	1MSVRRFESPPPYRPDEFKPNHYPSNDMVGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	138
Maus/1-521	1MSVRRFESPPPYRPDEFKPNHYPSNDMVGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	138
Hamster/1-523	1MSVRRFESPPPYRPDEFKPNHYPSNDVYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	138
Meerschwein/1-521	1MSSRPFESPPPYRPDEFKPNHYPSNDIYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	136
Tupaia/1-521	1MSSRPLESPPPYRPDEFKPNHYPSNDIYGGEMHVRPMLSQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	137
Kaninchenkänguru/1-489	1MMYEKRSY.....TGQHPSSHYDYPFSS.....PPSRYLDVPPQHFDWRSPPGLVRLGGSSVILCLVIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	115
Huhn/1-504	1MFSKKSVDGPPGYPPTGYGPTDYGYSSP.....PPSRYLDVPPQHFDWRSPPGLVRLGGSSVILCLVIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	120
Krallenfrosch/1-493	1MYSR.....PSYKDYGGEMR.....SQPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	119
Goldfisch/1-500	1MSLKPHGSPR.....FYDYQTEGDFLGP.....DPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	132
Zebrafisch/1-500	1	RVHRCLNRRSSKHIGSPR.....FYDYQTEGDFLGP.....DPYSFYFPEDELHFYKWTSPGGVIRILSMLIVMCIIFICVSTLWDRGGYGTSLGGSGYGYG.....SGFGSGYSGYGYG.....YGYGYGYGYG.....GYTDPRAAK	132
Mensch/1-522	139	GFMLEMAFCFIALVLVFTSVIRSEMSRTRRYLLSVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSLYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Orang-Utan/1-522	139	GFMLEMAFCFIALVLVFTSVIRSEMSRTRRYLLSVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSLYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Schwein/1-522	139	GFFLMAFCFIALVLVFTSVIRSEISRTRRYYLTVIIVSILGVMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSLYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Hund/1-521	138	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSDISRTRRYYLTVIIVSILGVMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSLYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	288
Rind/1-522	138	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSDISRTRRYYLTVIIVSILGVMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSLYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Ratte/1-523	139	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSDISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSMYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Maus/1-521	137	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSDISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSMYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	288
Hamster/1-523	139	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSDISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSMYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Meerschwein/1-521	137	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSEISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSIYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	288
Tupaia/1-521	138	GFLLMVFCFIALVLVFTSVIRSEISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSIYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	288
Kaninchenkänguru/1-489	116	GFMIMAVLCLFVLTGLVIGLSKSGSRRRFYLLVLSGLLVFVMLIASIVYVYVNPRAQGLSSGLYVQMLLMCQNMSPVAGIIMQYLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	286
Huhn/1-504	127	GFMIMAVLCLFVLTGLVIGLSKSGSRRRFYLLVLSGLLVFVMLIASIVYVYVNPRAQGLSSGLYVQMLLMCQNMSPVAGIIMQYLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	274
Krallenfrosch/1-493	120	GFLIMVFCFIALVLVFTSVIRSEISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSIYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	271
Goldfisch/1-500	133	GFMIMVFCFIALVLVFTSVIRSEISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSIYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	286
Zebrafisch/1-500	137	GFMIMVFCFIALVLVFTSVIRSEISRTRRYYLTVIIVSILGIMVFIATIVYIMGNPTQSG.....SGSIYGSQIYLCNQFYTPAGTGLYDQDLYHYCVVDPEIIVLGFMIIVFALIIFFVKTTRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQ.....	290
Mensch/1-522	291	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	443
Orang-Utan/1-522	291	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	443
Schwein/1-522	291	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	443
Hund/1-521	290	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	443
Rind/1-522	291	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	443
Ratte/1-523	291	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	443
Maus/1-521	289	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	444
Hamster/1-523	291	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	444
Meerschwein/1-521	290	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	444
Tupaia/1-521	289	PPNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	444
Kaninchenkänguru/1-489	270	PNVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	410
Huhn/1-504	275	PDVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	425
Krallenfrosch/1-493	272	PDVEEWNKNSAGTQDVPSPDSDYERVDSPMYSNKGKNDKRRYPESYKSTFVPEVQDELPLTSPVDFRQPRYSGGNLETSPKRPKKRRGSKRRT...EODHYETDYTGGESCDELEED...WIREYPIITSDQQRQLYKRNFDTGLOEY...	415
Goldfisch/1-500	287	PKDVEDWVNDVNEVP...EPMLI...EYPMKFGGSRSYLDNNSSTNYDKPPPSSES...PVELEHGLIRSSVP...LSSGSEMNSGR...PKKRRGSKRRT...DRRDHDTDYSSG...DELDDDFSEFPPIINNEEDYKRLFDDKHQEY...	422
Zebrafisch/1-500	291	PKDVEDWVNDVNEVP...EGLL...DYPKFG...SRNNLDNNSSTNYDKPPPSSES...PVELEHGLIRSSVP...LSSGSEMNSGR...PKKRRGSKRRT...DRRDHDTDYSSG...DELDDDFSEFPPIINNEEDYKRLFDDKHQEY...	422
Mensch/1-522	444	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Orang-Utan/1-522	444	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Schwein/1-522	444	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Hund/1-521	443	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	521
Rind/1-522	444	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Ratte/1-523	445	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	523
Maus/1-521	443	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Hamster/1-523	445	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	523
Meerschwein/1-521	443	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Tupaia/1-521	443	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	522
Kaninchenkänguru/1-489	411	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	521
Huhn/1-504	428	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	488
Krallenfrosch/1-493	416	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	493
Goldfisch/1-500	423	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	500
Zebrafisch/1-500	423	KSLQSELDEINKELS...RLDKELDD...YREESEYMAA...DEYNRLKQVKGS...DYKSKKNHC...KQLKSKLSH...IKKMVG...DYDRKRT...	500

Abb. A1: Sequenzalignement von Occludin zwischen verschiedenen Arten.