

Untersuchungen zum Bindungsmechanismus von Occludin und α -Catenin an ZO-1

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

Diplombiochemiker Sebastian Ludwig Müller
geboren am 18.11.1974
in Haldensleben

Berlin, August 2005

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hartmut Oschkinat
2. Prof. Dr. Otmar Huber

Disputation am: 18.01.06

Danksagung

Den Herrn Dr. G. Krause und PD Dr. I. E. Blasig möchte ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Ebenso danke ich ihnen sowie allen Mitgliedern der AGs „Biocomputing“ und „Molekulare Zellphysiologie“ für Unterstützung und gewinnbringende Diskussionen während der Ausführung dieser Doktorarbeit.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG, die diese Arbeit im Rahmen eines gemeinsamen Projektes von PD Dr. I.E. Blasig und Dr. G. Krause (Thema: „Wechselwirkung von Blut-Hirnschranken-Proteinen und deren Regulation“) förderte (BL308/6-1, 6-2).

Für die Einführung in die SPR-Technik und die Möglichkeit von SPR-Messungen danke ich der Abt. Peptidchemie und Biochemie unter Leitung von Prof. Dr. M. Bienert, insbesondere Frau Pisarz.

Für die Synthese einiger Peptide und der Peptidmembranen bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Schneider-Mergener von der Charité. Ein besonderer Dank gilt M. Portwich für Hilfe bei den experimentellen Arbeiten zum Peptidmapping und informative Diskussionen.

Ein Dankeschön gilt der Diplomandin Birgit Lassowski für die Unterstützung bei den biophysikalischen Untersuchungen, sowie allen dabei beteiligten Kooperationspartnern: Dr. M. Kolbe/MDC (Kristallographie), Dr. K. Gast/MDC (Lichtstreuung und Circular dichroismus), Dr. D. Labudde und H. Strauss (Analytische Ultrazentrifugation), Dr. M. Schümann und H. Lerch (Massenspektroskopie), Dr. D. Lorenz und Frau M. Ringling (Elektronenmikroskopie).

Schlussendlich danke ich meiner Mutter für Ansporn und kritisches Lesen.

Abkürzungsverzeichnis

AF-6	ALL-1 (<i>akute lymphatic leukemia</i>) Fusionspartner von Chromosom 6
AJ	<i>Adherens junction(s)</i>
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AMD	Adhäsion-Modulationsdomäne
aPKC	atypische Proteinkinase C
AS	Aminosäuren
ASIP	aPKC isotyp-spezifisch interagierendes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
BHS	Blut-Hirnschranke
bp	Basenpaare
CAD	Calcium-Adhäsionsdomäne (in Cadherinen)
CAR	Zelladhäsionserkennung (<i>cell adhesion recognition</i>)
CASK	Calcium/Calmodulin-abhängige Serinproteinkinase
CC	Coiled coil
CCa, b	von Vorhersagen und Modellen abgeleitete CC-Helix in Occludin
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
CK2	Caseinkinase 2
CLMP	Coxsackie und Adenovirusrezeptor-ähnliches Membranprotein (<i>coxsackie and adenovirus receptor-like membrane protein</i>)
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
Cx	Connexin (mit Angabe der Molmasse in kDa)
Dlg	discs large von <i>Drosophila melanogaster</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drome	<i>Drosophila melanogaster</i>
DSS	Disuccimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Extrazellulärer Loop (<i>extracellular loop</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
fastA	ein Programm zum Suchen von Sequenzähnlichkeiten in einer Datenbank zu einer gegebenen Startsequenz
GCN4	generelles Kontrollprotein 4 (<i>generell control protein 4</i>) (ein Transkriptionsfaktor in Hefe)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GKAP	GUK assoziiertes Protein
GMP	Guanosinmonophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GUK	Guanylatkinase bzw. Guanylatkinase-ähnliche Domäne
Ha, Hb, Hc	von Vorhersagen und Modellen abgeleitete Helices in Occludin
HA/P	Hämagglutinin/Protease
hCASK	humanes CASK

His ₆	Proteinmarker aus 6 Histidinen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	Humane Nabelschnur Endothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
IF	Intermediärfilament(e)
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JACOP	Junction-assoziiertes coiled coil Protein
JAM	junctionales Adhäsionsmolekül
LB	Lauria-Bertram-Medium
LYRIC	Lysin-reiches CEACAM1 co-isoliertes Protein (<i>lysin rich CEACAM1 co-isolated protein</i>)
MAGI	invertiertes MAGUK-Protein (<i>MAGUK inverted protein</i>)
MAGUK	Membranassoziiertes Guanylatkinase-homologes Protein
MALDI	Matrixunterstützte-Laserdesorptions-Ionisation (<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>)
MARVEL	Domäne in Proteinen mit 4 Transmembranbereichen aus den Proteinfamilien von Myelin und Lymphocyten, Physinen, Gyrienen und Occludin
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MCS	Multiklonierungsstelle (<i>multi cloning site</i>)
MDC	Max-Delbrück-Center
MDCK	Madin-Darby Nierenzellen aus Hund (<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>)
MS	Messenspektrometrie
M. Tuberc.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MUPP1	Multi-PDZ Domänenprotein 1
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	Minimalmedium (<i>new minimal medium</i>)
NMR	Kern-Spin-Resonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
PA	Paraformaldehyd
PADJ	Pals1 assoziiertes <i>tight junction</i> Protein (<i>Pals1 associated tight junction protein</i>)
PAR	defektes Aufteilungsprotein (<i>partitioning defective protein</i>)
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein-Datenbank (für dreidimensionale Strukturen jede mit einer vierstelligen Buchstaben-Zahlen Kennnummer)
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1 Domäne (ev. noch Zahl dahinter, wenn eine bestimmte PDZ-Domäne aus einem Protein mit multiplen PDZs gemeint ist)
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PP	Polyprolinregion
pS	Phosphoserin
PSD	Postsynaptisches Dichtheitsprotein
PSI	Pfund pro Quadratzoll (<i>pound per square inch</i> , 1PSI = 6,9 kPa)
Oc	Occludin
RMSD	mittlere quadratische Abweichung (<i>root-mean-square deviation</i>)
R _s	Stokes-Radius
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit (resonance unit)
SAF-B	Gerüstanheftungsfaktor B (<i>scaffold attachment factor B</i>)

SAP	Synapsen-assoziiertes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatografie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SEM	standard error of mean
SH3	Src homologe 3 Domäne (<i>src homology 3 domain</i>)
SLS	Statische Lichtstreuung
SNAP	Synaptosome-assoziiertes Protein
SNARE	SNAP Rezeptor
SP	Säulenpuffer
SPR	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
SS	Sekundärstrukturen
STAT	Signaltransducer und Activator der Transkription)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand (<i>transepithelial electrical resistance</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluor acetic acid</i>)
TJ	Tight junction(s) (dichte Zellverbindungen)
TM4	vierter transmembranaler Bereich eines Proteins
TMR	Tetramethylrhodamin (ein roter Farbstoff)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	vakulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VAMP	Vesikel assoziiertes Membranprotein
VAP-33	33 kDa großes VAMP-assoziiertes Protein
VH1-3	Vinculin homologe Regionen 1-3 in α -Catenin
WT	Wildtyp
WW	Proteinbindungsdomäne an Polyprolinmotive mit zwei konservierten Tryptophanen (W)
ZAK	ZO-1 assoziierte Kinase
ZNS	Zentralnervensystem
ZO-1,2,3	Zonula occludens Protein 1 bzw. 2 oder 3
ZONAB	ZO-1 assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein

Aminosäuren sind mit den üblichen Einbuchstabensymbolen abgekürzt:

A= Alanin, C= Cystein, D= Asparaginsäure, E= Glutaminsäure, F= Phenylalanin, G= Glycin, H= Histidin, I= Isoleucin, K= Lysin, L= Leucin, M= Methionin, N= Asparagin, P= Prolin, Q= Glutamin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin, W= Tryptophan, Y= Tyrosin.

Analog sind auch die DNA-Basen abgekürzt:

A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin, T= Thymin

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII

1. Einleitung **1**

1.1. Stand der Forschung zu den <i>Tight junctions</i>	1
1.1.1. Die Rolle und Bedeutung der <i>Tight junctions</i> in verschiedenen Organen	1
1.1.2. <i>Tight junctions</i> sind Teil des Kontaktbereiches zwischen Zellen	3
1.1.3. Morphologie und Funktion von <i>Tight junctions</i>	4
1.1.4. Molekularer Aufbau der <i>Tight junctions</i>	9
1.1.4.1. Occludin	10
1.1.4.2. Die Claudinproteinfamilie	15
1.1.4.3. Die <i>zonula occludens</i> -Proteine 1, 2 und 3	17
1.1.5. Morphologie, molekularer Aufbau und Funktion von <i>Adherens junctions</i>	21
1.1.5.1. Das <i>Adherens junction</i> Protein α -Catenin	21
1.2. Das Coiled Coil-Interaktionsmotiv	22
1.3. Homologiemodelle	25
1.3.1. Voraussetzungen für die Generierung von homologen Strukturmodellen	25
1.3.2. Experimentelle Strukturvorlagen	26
1.4. Zielstellung der Arbeit	27

2. Material und Methoden **28**

2.1. Molekularbiologische Methoden	28
2.1.1. Herstellen der Konstrukte von Occludin, ZO-1 und α -Catenin	28
2.1.1.1. Herstellung der Occludinkonstrukte	28
2.1.1.2. Herstellung der ZO-1-Konstrukte	29
2.1.1.3. Herstellung der α -Cateninkonstrukte	31
2.1.1.4. Herstellung sonstiger Konstrukte mit der QuickChange®-Methode	32
2.1.2. Expression und Reinigung der Proteine	33
2.1.2.1. Reinigung der MBP-Fusionsproteine	33

2.1.2.2. Reinigung der GST-Fusionsproteine	34
2.1.2.3. Herstellung und Reinigung des selenomethioninhaltigen Occludins für die Kristallisation	35
2.1.3. Abtrennung des MBP vom Occludin für biophysikalische Untersuchungen	35
2.1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Coomassiefärbung und Proteinkonzentrationsbestimmung	38
2.2. Messungen der Protein-Protein-Interaktionen mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	38
2.2.1. Suche nach einer verbesserten Regenerationslösung für die SPR-Messungen	40
2.2.2. Auswertung der SPR-Messergebnisse	44
2.3. Identifikation von an der Occludin/ZO1- bzw. α-Catenin/ZO-1-Bindung beteiligter Peptidepitope	46
2.3.1. Synthese der Peptide auf Membranen	46
2.3.2. Herstellung von Tetramethylrhodamin-gekoppelten Peptiden und ihre Bindung an Peptidmembranen	46
2.3.3. Bindung von GST-Fusionsproteinen an Peptidmembranen	47
2.4. Generierung der Homologiemodelle und verwendete bioinformatische Methoden	48
2.4.1. Sequenzvergleiche und Sequenzanalysen	48
2.4.2. Das Erzeugen der Homologiemodelle	49
2.5. Untersuchung von Occludin mit biophysikalischen Methoden	53
2.5.1. Analytische Größenausschlusschromatographie von Occludin	53
2.5.2. Massenspektroskopie von Occludin	53
2.5.3. Kristallisation von Occludin	54
2.5.4. Circular dichroismus-Spektroskopie	54
2.5.5. Dynamische und statische Lichtstreuung zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Occludin	55
2.5.6. Analytische Ultrazentrifugation von Occludin	55
2.5.7. Elektronenmikroskopie von Occludin	56
2.5.8. Quervernetzung von Occludin	56
2.5.9. Temperaturstabilität von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	56
2.6. Statistische Auswertung	57

3. Ergebnisse	58
3.1. Bioinformatische Analyse der Proteine	58
3.1.1. Bioinformatische Analyse von Occludin	58
3.1.2. Bioinformatische Analyse von α -Catenin	61
3.1.3. Bioinformatische Analyse von ZO-1	62
3.1.4. Zusammenfassung der bioinformatischen Untersuchungen von Occludin, α -Catenin und ZO-1	67
3.2. Monomere Homologiemodelle von Occludin, α-Catenin und ZO-1	69
3.2.1. Monomermodell von Occludin	69
3.2.2. Strukturen und Monomermodelle von α -Catenin	71
3.2.3. ZO-1-Monomermodell	72
3.2.4. Schlussfolgerungen aus den Monomermodellen für die Interaktion von Occludin/ZO-1 und α -Catenin/ZO-1	74
3.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den monomeren Homologiemodellen von Occludin, α -Catenin und ZO-1	77
3.3. Studieren der Proteinbindungen mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	77
3.3.1. Untersuchung der ZO-1/Occludin-Interaktion	77
3.3.2. ZO-1-Bindung an verschiedene α -Cateninkonstrukte	82
3.3.3. Untersuchungen zu Homoassoziation verschiedener ZO-1-Konstrukte	83
3.3.4. Eine Mischung von Occludin/ZO-1 in Lösung verringert die ZO-1-Bindung an immobilisiertes Occludin bzw. α -Catenin	86
3.3.5. Zusammenfassung der SPR-Ergebnisse	88
3.4. Analyse der Bindungsepitope in ZO-1, Occludin und α-Catenin	88
3.4.1. ZO-1-Peptide binden ähnliche Epitope in Occludin und α -Catenin	88
3.4.2. Occludin und α -Catenin erkennen gleiche Epitope in ZO-1	93
3.4.3. Einfluss von Phosphorylierung der ZO-1-Hingeregion auf die Occludinbindung untersucht mit Peptidinteraktionen	94
3.4.4. Zusammenfassung der Peptidbindungsergebnisse	95
3.5. Hinweis auf Dimerisierung von Occludin durch biophysikalische Untersuchungen	96
3.5.1. Analytische Größenausschlusschromatographie von Occludin	96
3.5.2. Massenspektroskopie von Occludin	97

3.5.3. Kristallisation von Occludin	98
3.5.4. Circular dichroismus-Spektroskopie	100
3.5.5. Dynamische und statische Lichtstreuung zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Occludin	101
3.5.6. Analytische Ultrazentrifugation vom Occludin	104
3.5.7. Elektronenmikroskopie von Occludin	105
3.5.8. Quervernetzung von Occludin	106
3.5.9. Temperaturstabilität von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	107
3.6. Dimere Homologiemodelle von Occludin und ZO-1	108
3.6.1. Dimermodelle von Occludin	108
3.6.2. ZO-1-Dimermodelle	110
3.6.3. Zusammenfassung der biophysikalischen Untersuchungen und der Vergleich mit den Dimermodellen	112
4. Diskussion	114
4.1. Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden sowie Aussagekraft der Resultate	114
4.2. Identifizierung der Bindungsepitope von α -Catenin, Occludin und ZO-1	117
4.3. Die Bedeutung der Hingeregion für MAGUK-Proteine und der Einfluss von Phosphorylierungen	119
4.4. Vergleich der Bindungsexperimente Occludin/ZO-1 und α -Catenin/ZO-1	121
4.5. Monomermodelle von α -Catenin ₅₀₉₋₆₃₀ /ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆ und Occludin ₄₀₀₋₅₂₁ /ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆ zeigen keine komplementären Interaktionsmuster	123
4.6. Komplementäre Interaktion der Dimermodelle von Occludin ₄₀₀₋₅₂₁ /ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆ sowie der Monomermodelle von α -Catenin ₆₈₅₋₈₅₅ /ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆	124
4.7. Analyse des vorgeschlagenen Interaktionsmodells von Occludin und ZO-1 und Vorstellung eines Oligomerisierungsmodells für ZO-1 mit Adaptorfunktion des Occludins	126

5. Zusammenfassung **132**

6. Literaturverzeichnis **135**

7. Anhang **148**

7.1. Weitere Alignments **148****7.2. Schema zum Verständnis der Peptidmappingexperimente** **156****7.3. Abstract** **157**Lebenslauf **158**Selbständigkeitserklärung **161**

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1.1. Schema der Zellstrukturen des Zellkontaktbereichs (<i>junctional complex</i>) von Epithel- und Endothelzellen	3
Abb. 1.2. Querschnittsansicht von <i>Tight junctions</i> zwischen zwei Zellen	6
Abb. 1.3. Gefrierbruchdarstellung von <i>Tight junctions</i> aus MDCK-Zellen	6
Abb. 1.4. Schema der wichtigsten Proteine in <i>Tight junctions</i> und <i>Adherens junctions</i>	9
Abb. 1.5. Schema des transmembranalen TJ-Proteins Occludin	12
Abb. 1.6. Allgemeines Schema der TJ-Proteinfamilie der Claudine	15
Abb. 1.7. Schema der Bindungsregionen von ZO-1	18
Abb. 1.8. Schema von α -Catenin mit identifizierten Proteinbindungsbereichen	22
Abb. 1.9. Schema zum Prinzip der CC-Wechselwirkung	23
Abb. 1.10. Beziehung zwischen dem Anteil identischer Aminosäurereste (Sequenzidentität) und der Länge der verglichenen Sequenzen	25

2. Methoden

Abb. 2.1. Acrylamid-Gel der proteinhaltigen Fraktionen 24-34 der Größenausschlusschromatographie von MBP und Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	36
Abb. 2.2. Trennung von MBP und Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ durch Dialyse und Affinitätschromatographie	37
Abb. 2.3. Prinzip der SPR-Spektroskopie	39
Abb. 2.4. Schema eines SPR-Sensorgramms mit Darstellung des Regenerationseffektes verschiedener Lösungen	42

3. Ergebnisse

Abb. 3.1. Alignment des gesamten C-terminalen zytosolischen Bereichs von Occludin von acht verschiedenen Arten	59
Abb. 3.2. Alignment von Maus-Occludin ₄₀₀₋₅₂₁ mit den gefundenen Strukturvorlagen aus der PDB	60
Abb. 3.3. Analyse von Maus- α -Catenin mit den vinculinhomologen Regionen VH1-3	61
Abb. 3.4. Domänenstruktur von ZO-1 mit Lage der vorhergesagten CC-Elemente und Liste bekannter Kristallstrukturen	64

Abb. 3.5. Überlagerung von drei homologen GUK-Strukturen	65
Abb. 3.6. Proteinrückradansicht der SH3-GUK-Struktur von PSD-95	66
Abb. 3.7. Sequenzvergleich von Maus-ZO-1 ₅₁₈₋₈₁₂ mit der gefundenen Strukturvorlage aus der PDB	67
Abb. 3.8. Sequenzvergleich von ZO-1 ₅₁₈₋₈₁₂ mit der Strukturvorlage 1KJW und weiteren PDB-Strukturen	68
Abb. 3.9. Schema des Occludinmonomermodells mit farblicher Kennzeichnung der Herkunft der für die Modellierung wichtigen Bereiche	70
Abb. 3.10. Darstellung des Occludinmonomermodells	71
Abb. 3.11. Darstellung der Kristallstruktur α -Catenin ₅₀₉₋₆₃₀ und von einem Modell der VH3-Region von α -Catenin ₆₈₅₋₈₅₅	72
Abb. 3.12. Ausschnitte aus dem Sequenzvergleich in Abb. 3.7. von ZO-1 mit PSD-95 zusätzlichen Fragmentstrukturvorlagen für die Konstruktion der Hingeregion	73
Abb. 3.13. Darstellung des ZO-1-Monomermodells der SH3-Hinge-GUK-Einheit	74
Abb. 3.14. Maßstabsgetreue Gegenüberstellung der Monomer-Architekturmodelle von Maus-Occludin ₄₀₀₋₅₂₁ und der SH3-Hinge-GUK-Einheit von Maus-ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆	75
Abb. 3.15. Maßstabsgetreue Gegenüberstellung der Kristallstruktur α -Catenin ₅₀₉₋₆₃₀ , sowie von Monomer-Architekturmodellen der VH3-Region von α -Catenin ₆₈₅₋₈₅₅ und der SH3-Hinge-GUK-Einheit von ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆	76
Abb. 3.16. Schematische Darstellung der verwendeten Occludinkonstrukte	78
Abb. 3.17. Relative Occludinbindung verschiedener ZO-1-Konstrukte	80
Abb. 3.18. SPR-Bindungskurven verschiedener Konzentrationen von ZO-1 ₅₈₉₋₈₁₂ an Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	81
Abb. 3.19. Gegenüberstellung der Bindungsmessungen von ZO-1 an Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ und drei verschiedene α -Cateninkonstrukte	82
Abb. 3.20. Homoassoziationen verschiedener ZO-1-GUK-Fragmente untereinander und zum Vergleich mit Occludin ₄₃₄₋₅₂₁	84
Abb. 3.21. Kompetitionsstudie mit immobilisiertem Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ und α -Catenin ₅₀₉₋₉₀₆ mit ZO-1 ₅₀₂₋₈₀₃ als Analyt, jeweils unmittelbar vor der Messung mit Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ gemischt	87
Abb. 3.22. Schema der durchgeführten Peptidmembranexperimente	89

Abb. 3.23. Bindung der Peptide ZO-1 ₅₉₇₋₆₃₃ und ZO-1 ₇₄₅₋₇₇₂ an punktförmig membrangekoppelte Peptide aus Occludin ₄₀₀₋₅₂₁	90
Abb. 3.24. Bindung der Peptide ZO-1 ₅₉₇₋₆₃₃ ZO-1 ₇₄₅₋₇₇₂ , und ZO-1 ₇₂₉₋₇₄₃ an punktförmig membrangekoppelte Peptide aus α -Catenin ₅₀₉₋₉₀₆	91
Abb. 3.25. Bestimmung der Occludin- und α -Cateninbindungsregionen in ZO-1	93
Abb. 3.26. Bindung von GST-Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ an Peptidmembranen aus der Hingeregion von ZO-1 mit Mutationen, die eine Serinphosphorylierung simulieren	94
Abb. 3.27. Größenausschlusschromatographie von MBP-freiem Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	97
Abb. 3.28. MALDI-MS von MBP-freiem Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	98
Abb. 3.29. Proteinkristalle von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	99
Abb. 3.30. Massenspektroskopische Analyse des Selenomethioninderivats von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	99
Abb. 3.31. CD-Spektroskopie von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ und dem H2-Peptid ZO-1 ₇₄₅₋₇₇₂	100
Abb. 3.32. Messungen zum Oligomerisierungsgrad durch DLS	101
Abb. 3.33. Analytische Ultrazentrifugation Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	104
Abb. 3.34. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	105
Abb. 3.35. Chemische Vernetzung von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ , MBP-Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ und MBP mit Paraformaldehyd und Disuccimidylsuberat	106
Abb. 3.36. Untersuchungen zur Temperaturstabilität von Occludin ₄₀₆₋₅₂₁	107
Abb. 3.37. Paralleles Dimermodell von Occludin ₄₀₀₋₅₂₁	108
Abb. 3.38. Antiparalleles Dimermodell von Occludin ₄₀₀₋₅₂₁	109
Abb. 3.39. Vorstellung wie zwei ZO-1-Monomermodelle zu einem Dimermodell zusammengesetzt werden	111
Abb. 3.40. Dimermodell von ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆	112
Abb. 3.41. Architektonische/strukturelle Dimermodelle von Occludin-C-Terminus und der ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Einheit in gleichem Maßstab	113

4. Diskussion

Abb. 4.1. Grundprinzipien des <i>Domainswappings</i> mit beobachteten Varianten	127
Abb. 4.2. Modellvorstellung, wie Occludin mit dem SH3-GUK-Bereich von ZO-1 interagieren könnte, um lange TJ-Stränge zu erzeugen	128
Abb. 4.3. Offenes Dimermodell von ZO-1 ₅₁₈₋₈₀₆ mit Domänenaustausch	129

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

Tabelle 1.1. Zusammenfassung der wichtigsten Proteine in den Bestandteilen des Zellkontaktbereichs.	4
--	---

2. Methoden

Tabelle 2.1. Verwendete Primersequenzen für Occludinkonstrukte	29
Tabelle 2.2. Verwendete Primersequenzen für ZO-1-Konstrukte	31
Tabelle 2.3. Verwendete Primersequenzen für α -Cateninkonstrukte	32
Tabelle 2.4. Verwendete Primersequenzen für QuickChange®-Mutagenesen	33
Tabelle 2.5. Für die Suche nach einem besseren Regenerationsmittel des SPR-Chips verwendete Ausgangslösungen	41
Tabelle 2.6. Regenerationseffizienz verschiedener Regenerationslösungen	43
Tabelle 2.7. Regenerationseffizienz von Mischungen der besten drei Einzellösungen von Tabelle 2.6.	43

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1. Vergleich der verschiedenen CC-Vorhersagen in Maus-Occludin	60
Tabelle 3.2. Vergleich der verschiedenen CC-Vorhersagen in Maus- α -Catenin	62
Tabelle 3.3. Vergleich der verschiedenen CC-Vorhersagen in Maus-ZO-1	63
Tabelle 3.4. Vergleich der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten zwischen Occludin und PDB-Strukturvorlagen	69
Tabelle 3.5. Vergleich der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten zwischen ZO-1 und PDB-Strukturvorlagen	73
Tabelle 3.6. Normierte Bindungsergebnisse (Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ als 100%) von ZO-1-Konstrukten an verschiedene immobilisierte Occludinsequenzen	79
Tabelle 3.7. Vergleich der Bindungsergebnisse von ZO-1-Konstrukten (in fmol) an immobilisiertes Occludin ₄₀₆₋₅₂₁ , α -Catenin ₅₀₉₋₉₀₆ und ZO-1 ₅₀₂₋₈₁₂	85
Tabelle 3.8. Analyse der Aminosäurezusammensetzung der ZO-1-Peptide CC1, H1 und H2	92
Tabelle 3.9. Ergebnisse der Lichtstreuungsexperimente	102