

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Herstellen der Konstrukte von Occludin, ZO-1 und α -Catenin

2.1.1.1. Herstellung der Occludinkonstrukte

Als Ausgangspunkt aller in dieser Arbeit erzeugten Occludinfragmente diente die zytosolische C-terminale Sequenz von Mausoccludin₂₆₄₋₅₂₁ (Schmidt et al., 2001). Mit PCR wurden daraus Occludin₃₇₈₋₅₂₁, ₄₀₆₋₅₂₁, ₄₁₇₋₅₂₁, ₄₃₄₋₅₂₁, ₄₀₆₋₄₈₈, ₄₀₆₋₄₆₈, ₄₀₆₋₄₅₁ und ₄₁₇₋₄₅₁ unter Verwendung der in Tabelle 2.1. angegebenen Primer amplifiziert, wobei durch passend synthetisierte Sequenzen jeweils BamHI und Sall Restriktionsstellen in den Konstrukten generiert wurden. Die PCR aller cDNA-Transkripte erfolgte (z.T. leicht variiert) bei etwa 20 Zyklen mit 95 °C für 20 s, 68 °C für 1 min, 72 °C für 30 s. Es wurde von einer Elongationsgeschwindigkeit von 1000 bp/min für *Taq*-Polymerase ausgegangen, wobei die Elongationszeit je nach der Länge (in bp), des zu erzeugenden Konstrukts entsprechend modifiziert wurde. Durch Klonierung der PCR-Produkte in geeignete Vektoren (siehe unten) wurden die Konstrukte mit verschiedenen Markerproteinen für die spätere Aufreinigung versehen (MBP, GST, His₆).

Klonierungsstrategie: Die erhaltenen PCR-Amplifikate aus je rund 200 μ l Reaktionsansatz wurden über eine Minipräparationssäule (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt und in 30 μ l TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen. Nach Doppelrestriktionsverdau mit je 1 μ l BamHI und Sall in doppelt konzentriertem Y-Puffer (alles FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland; bei 37 °C für 3 h oder über Nacht) wurden die Fragmente zum Reinigen auf 2% Agarosegele aufgetragen. Die erhaltenen Banden (gefärbt mit Ethidiumbromid) wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mittels *QIAGEN DNA Gel Extraktion Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) in TE-Puffer eluiert. Danach wurden die geschnittenen PCR-Produkte in pMAL-c2X Vektor (*New England Biolabs*, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerangaben subkloniert. Um Fehler aus der PCR-Amplifikation und der anschließenden Klonierung auszuschließen, wurde die Richtigkeit der Sequenz aller Klone durch Sequenzierung (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems, Warrington, GB; Service durch Sequenzierungsgruppe am FMP) überprüft. Zur Erzeugung von GST- bzw. His₆-Tag Fusionsproteinen wurden die gewünschten Sequenzen mit den Enzymen EcoRI und Sall aus dem pMAL-c2X Vektor herausgeschnitten, im Agarosegel wie oben für die PCR-Produkte beschrieben gereinigt und in pGEX-4T-1 bzw. pET-28a Vektoren (Novagen, MERCK Biosciences, Bad Soden,

Deutschland) umkloniert. Alle Vektoren wurden in *E. coli* Zellen (TOP10F', Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transformiert.

Bei der Nutzung der BamHI-Schnittstelle vom pMal-c2X Vektor verbleiben in den Konstrukten noch 6 AS (ISEFGS), die Reste des multiplen Klonbereichs sind. Um diese nicht nativen AS für die Kristallisationsansätze zu entfernen, wurden die zwei Konstrukte Occludin $\Delta_{400-521}$ und Occludin $\Delta_{406-521}$ hergestellt. Die Inserts wurden mit den be-Primern und dem Rückwärtsprimer ab P521 aus Tabelle 2.1. sowie mit Pfu-Polymerase erzeugt, da Taq-Polymerase unspezifische 5'-Überhänge mit der Base A bildet. Restriktion, Reinigung u.a. Schritte erfolgten wie oben nur mit z.T. anderen Enzymen. Die Inserts wurden nur mit Sall geschnitten, da ihre anderen Enden schon durch die verwendeten Primer mit dem richtigen stumpfen Ende abschlossen. Der leere pMal-c2X Vektor wurde mit je 1 μ l Sall und XmnI in O⁺-Puffer (FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland) bei 37 °C über Nacht verdaut. Nach der Reinigung wurden je 200 ng geschnittenes Plasmid sowie je der 5-fachen molaren Menge Insert mit T4-Ligase (FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland) über Nacht bei 16 °C inkubiert und in Top 10 *E.coli*-Zellen transformiert.

Tabelle 2.1. Verwendete Primersequenzen für Occludinkonstrukte. Zur Identifikation der Primer sind jeweils die Aminosäuren (im Einbuchstabencode) einschließlich ihrer Positionsnummern aus der Maus-Occludinsequenz angegeben mit denen die Vorwärtsprimer beginnen bzw. die Rückwärtsprimer enden. Die eingeführten Restriktionsstellen (GGA TCC = BamHI, GTC GAC = Sall) sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Die Stopcodons in den Rückwärtsprimern (CTA) sind fett. Die mit „be“ bezeichneten Primer dienten zum Herstellen von *blunt end* Konstrukten.

AS-Nr.	Vorwärtsprimer
ab K378	AAA <u>GGA TCC</u> AAA AGG GCT CCC ACG AAG GGG AAA
ab E406	AAA <u>GGA TCC</u> GAG TCC TGC GAG GAG CTG GAG GAG
ab R417	GGG <u>GGA TCC</u> AGG GAA TAT CCA CCT ATC ACT TCA
ab N434	AGG <u>GGA TCC</u> AAT TTT GAT GCA GGT CTG CAG GAG
ab E406_be	GAG TCC TGC GAG GAG CTG GAG
ab D400_be	GAC TAC ACG ACA GGT GGG GAG
AS-Nr.	Rückwärtsprimer
revers ab D451	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAG TCG TCT AGT TCT GCC TGT AAG CT
revers ab E468	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAC TCT CTG TAG TCA TCC AGC TC
revers ab G488	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAT CCC TTA ACT TGC TTT AGT CT
revers ab P521	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAA GGT TTC CGT CTG TCA TAG TC

2.1.1.2. Herstellung der ZO-1-Konstrukte

Viele der ZO-1-GUK-Sequenzen waren schon in der Arbeitsgruppe durch PCR aus cDNA von Maus-ZO-1 hergestellt worden (Schmidt et al., 2001). ZO-1-Sequenzen mit der SH3-Domäne wurden durch PCR von cDNA von humanem ZO-1 (von Alan Fanning, Chapel Hill, NC, USA; Fanning et al., 1998) abgeleitet. Die ZO-1-Sequenzpositionen von Maus und

Mensch weichen im Bereich von SH3-Hinge-GUK um 12 Aminosäuren voneinander ab, d.h. die Aminosäure D800 in der humanen Sequenz entspricht D812 in der murinen Sequenz. Um Verwirrungen bei den Ergebnisangaben zu vermeiden, und weil die Sequenzen nahezu vollständig identisch sind, wurde im Weiteren, wenn nicht anders angegeben, nur die AS-Nummern der murinen ZO-1-Sequenz verwendet (Tabelle 2.2). Die murine und humane ZO-1 Sequenz unterscheidet sich im Bereich der SH3-Hinge-GUK nur unwesentlich in zwei AS-Positionen (L676 und H683 in Maus entsprechen den humanen AS-Positionen P664 und Q671). Die Sequenz von humanem ZO-1 aus der Swissprot-Datenbank weicht noch in vier weiteren Positionen (A533, Y676, A750, V778) vom murinen ZO-1 (V545, I688, R762, I790) ab. Beim Sequenzieren der humanen Klone ergab sich an diesen vier Positionen jedoch immer die Maus-Sequenz. Auch im Vergleich mit anderen ZO-Proteinen zeigen sich diese vier Positionen vollständig konserviert und in Übereinstimmung mit den Maus-Sequenzen, ebenso wie in den Angaben des Humanen Genomprojektes. Das deutet darauf hin, dass die Angaben in der Swissprot-Datenbank für diese vier Positionen im humanen ZO-1 nicht stimmen können. Da die erzeugten Homologiemodelle mit den Mausequenzen erstellt wurden, spielt das dort sowieso keine Rolle. Mit der gleichen Klonierungsstrategie wie bei 2.1.1.1. angegeben sowie den entsprechenden Primern aus Tabelle 2.2. wurden ZO-1₅₀₂₋₇₇₂, ZO-1₅₀₂₋₆₄₅, ZO-1₅₁₆₋₈₀₆ hergestellt. Zusätzlich wurden zwei komplexere Konstrukte erzeugt, um den Einfluss der aus dem Modeling vorhergesagten β -Stränge E und F besser zu verstehen. In ZO-1_{502-576+VDGN+631-645} wurde die Hingeregion zwischen SH3-Domäne und Strang E durch die Aminosäuren V D G N ersetzt. ZO-1_{502-645+VDGN+795-806} umfasst die SH3-Domäne mit Hingeregion einschließlich des Strangs E, woran über die Aminosäuren V D G N G N der Strang F gekoppelt wurde. Für beide Konstrukte wurden zunächst zwei Zwischenvektoren (ZO-1₅₀₂₋₅₇₆, ZO-1₅₀₂₋₆₄₅) ohne Stopcodon (Tabelle 2.2) erzeugt und in den pMAL-c2X-Vektor subkloniert. Die DNA-Nukleotid-Sequenzen der Stränge E bzw. F einschließlich Turn-AS und Stopcodons wurden je als Vorwärts- und Rückwärtsprimer synthetisiert. Die beiden Primer sind exakt komplementär bis auf jeweils vier DNA-Basen (TCGA) am 5'-Ende, die den überstehenden Enden einer Sall-Schnittstelle entsprachen. Die darauf folgende Base ist jedoch T statt C, so dass die Sall-Erkennungssequenz nach erfolgreicher Ligation nicht mehr vorhanden ist. Je 20 μ l von den beiden komplementären Primerlösungen (je 50 μ M) wurden gemischt und mit 20 μ l 2 M NaCl versetzt (\Rightarrow \sim 0,7 M Endkonzentration an NaCl), für 5 min bei 95 °C inkubiert und dann langsam bei RT abgekühlt. Dabei bilden sich die Primerdimere aus, die auch bei anschließender starken Verdünnung noch durch die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Basen zusammengehalten werden. Nach Sall-Verdau der

Zwischenkonstrukte wurden sie in einem Ligationsansatz mit T4-Ligase (FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland) und 20-30 fachem molaren Überschuss an Primerdimer versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Ebenfalls zugegebenes Sall verhindert ein Religieren des leeren Vektors. Die Vektoren mit eingebauten Primerdimer werden jedoch nicht geschnitten, da bei ihnen die Sall-Erkennungssequenz durch die eingebaute Primersequenz zerstört ist.

Tabelle 2.2. Verwendete Primersequenzen für ZO-1-Konstrukte. Zur Identifikation der Primer sind jeweils die Aminosäuren (im Einbuchstabencode) einschließlich ihrer Positionsnummern aus der Maus-ZO-1-Sequenz angegeben, mit denen die Vorwärtsprimer beginnen bzw. die Rückwärtsprimer enden. Die eingeführten Restriktionsstellen (GGA TCC = BamHI, GTC GAC = Sall) sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Die Stopcodons in den Rückwärtsprimern (**CTA**) sind fett. Die mit "oS" gekennzeichneten Primer enthielten kein Stopcodon und wurden zum Zwischenklonieren der Konstrukte ZO-1_{502-576+VDGN+631-645} und ZO-1_{502-645+VDGN+795-806} benutzt. An diese Konstrukte wurden dann über die unten angegebenen Primer die Sequenzen der β -Stränge E bzw. F angefügt. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer für die Stränge E und F sind komplementär bis auf je 4 Basen am 5'-Ende, die einem Sall-Überhang entsprechen (TCGA). Die darauffolgende Base (T) passt jedoch nicht zu einer Sall-Schnittstelle. So können diese Primer nach Dimerisierung mit ihren überstehenden 5'-Enden in eine Sall-Schnittstelle eingebracht aber nicht wieder ausgeschnitten werden. Am 3'-Ende tragen diese Primer ein Stopcodon (fett). Die verbindenden Aminosäuren ergaben sich z.T. aus dem Sall-Überhang (VD) oder wurden über die Primersequenzen zusätzlich eingefügt (GN bzw. GNGN), um einen Turn zu ermöglichen, damit die Stränge E bzw. F sich zum restlichen Protein optimal anordnen können. Die Anzahl der dabei einzufügenden Aminosäuren war durch die Fähigkeit zur Synthese langer Primer limitiert (hier maximal 60 Basen).

Primersequenzen für ZO-1	
AS-Nr.	Vorwärtsprimer
ab K502	AAA <u>GGA TCC</u> AAG AAG AAG GAC GTT TAT CGC CGC ATT G
ab G516	AAA <u>GGA TCC</u> GGA GAT TCT TTC TAT ATT AGA ACC CAT
mit Strand E	TCG ATG GAA ATC CAG CTT ATG AAA GAG TGG TTC TTC GAG AAG CTG GAT TTC TGA GGT AGA
mit Strand F	TCG ATG GTA ATG GCA ACA ACC AGC TGG TAT GGG TTT CCG AGG GAA AGG CGG ATT AGA
AS-Nr.	Rückwärtsprimer
revers ab P576 oS	TTT TTT <u>GTC GAC</u> ATT AGG GAT GAT GCC TCG TTC TAC CTC C
revers ab R645	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAC CTC AGA AAT CCA GCT TCT CGA AGA ACC
revers ab R645 oS	TTT TTT <u>GTC GAC</u> CCT CAG AAA TCC AGC TTC TCG AAG AAC C
revers ab T772	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAT GTA GTT GTA AAA AGA TGG TGA TTA TTT
revers ab D806	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAA TCC GCC TTT CCC TCG GAA ACC CA
revers Strand E	TCG ATC TAC CTC AGA AAT CCA GCT TCT CGA AGA ACC ACT CTT TCA TAA GCT GGA TTT CCA
revers Strand F	TCG ATC TAATCC GCC TTT CCC TCG GAA ACC CAT ACC AGC TGG TTG TTG CCA TTA CCA

2.1.1.3. Herstellung der α -Cateninkonstrukte

Hierzu wurde die komplette cDNA von murinem α -Catenin in einem pGEX-Vektor benutzt (von Ottmar Huber, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin, Deutschland, der aus dem publizierten pCIneo-Vektor abgeleitet war (Huber et al., 1997).

Es wurde die Klonierungsstrategie von 2.1.1.1. verwendet, jedoch mit einer EcoRI statt einer BamHI-Schnittstelle, da das α -Catenin-Gen eine endogene BamHI-Sequenz enthält. Unter Verwendung der Primer aus Tabelle 2.3. wurden die MBP- α -Catenin-Konstrukte₁₋₅₀₈, ₅₀₉₋₉₀₆, ₆₃₁₋₉₀₆, und ₆₃₁₋₇₆₆ hergestellt. Diese wurden auch zu GST-Konstrukten umkloniert.

Tabelle 2.3. Verwendete Primersequenzen für α -Cateninkonstrukte. Zur Identifikation der Primer sind jeweils die Aminosäuren (im Einbuchstabencode) einschließlich ihrer Positionsnummern aus der Maus- α -Catenin-Sequenz angegeben, mit denen die Vorwärtsprimer beginnen bzw. die Rückwärtsprimer enden. Die eingeführten Restriktionsstellen (GAA TTC = EcoRI, GTC GAC = Sall) sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Die Stopcodons in den Rückwärtsprimern (CTA) sind fett.

Primersequenzen von α -Catenin	
AS-Nr.	Vorwärtsprimer
ab M1	AAA GCA <u>AGA ATT</u> CAT GAC TGC CGT CCA CGC AGG CAA
ab D509	AAA GCA <u>AGA ATT</u> CGA TGA CTT CTT GGC TGT CTC AGA GAA
ab M631	AAA GCA <u>AGA ATT</u> CAT GAT CAG GAC CCC CGA GGA GTT G
AS-Nr.	Rückwärtsprimer
revers bis I906	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAG ATG CTG TCC ATG GCT TTG AAC TCG
revers bis H766	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAA TGG TCT GCG ATG GTC CGG CCG A
revers bis I508	TTT TTT <u>GTC GAC</u> TAG ATG GAA GTA ATG TCA TCA ACA GCA TC

2.1.1.4. Herstellung sonstiger Konstrukte mit der QuickChange®-Methode

Zu Kontrollzwecken wurde durch Einfügen eines Stopcodons in den multiplen Klonbereich des pMAL-c2X-Vektor (*New England Biolabs*, Frankfurt am Main, Deutschland) ein reines MBP-Konstrukt erzeugt. Es wurde die QuickChange®-Methode (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) in leicht modifizierter Form verwendet. Es wurden dazu zwei komplementäre Primer erzeugt, die in der Mitte die mutierte Sequenz enthalten. Danach wurde der Vektor mit den Primern erst einzeln in verschiedenen PCR-Ansätzen (mit 1,5 facher Mg^{2+} -Endkonzentration) für 7 PCR-Zyklen (30 s 95 °C, 60 s 65 °C, 20 min 72 °C) mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt und nach 5 weiteren PCR-Zyklen wurde die Annealingtemperatur auf 62,5 °C herabgesetzt für weitere 17 PCR-Zyklen. Dieser Verlauf der Annealingtemperatur wurde erst nach einigen fehlgeschlagenen Versuchen gefunden und muss wahrscheinlich für jedes andere Primerpaar neu getestet werden. Die unmutierten Ausgangvektormoleküle wurden vorher aus *E. coli* isoliert und waren von den Bakterienzellen methyliert worden. Sie wurden durch Verdau (2 h, 37 °C) mit DpnI (*New England Biolabs*, Frankfurt am Main, Deutschland) zerstört. Die mutierten Vektoren wurden in *E. coli* transformiert und durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit bestimmt. Auf die gleiche Weise wurde die Xa-Schnittstelle (IEGR) und 6 weitere Aminosäuren (ISEFGS), die noch Reste des multiplen Klonbereichs sind, aus dem Konstrukt ZO-1₅₁₆₋₈₁₂ entfernt und durch Aminosäuren für zwei andere spezifischere Proteasen ersetzt.

Sowohl in der Erkennungssequenz der *Precision*-Protease (LEVLFQ↓GP) als auch der TEV-Protease (ENLYFQ↓G) erfolgt die Spaltung (↓) jeweils zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin. Diese anderen Protease-Konstrukte sollen MBP aus MBP-ZO-1-Fusionsproteinen für weiterführende Experimente abspalten, ohne dabei wie Faktor Xa das ZO-1 unspezifisch zu spalten (siehe Abschnitt 2.1.3).

Tabelle 2.4. Verwendete Primersequenzen für QuickChange®-Mutagenesen. Angegeben sind jeweils die Vorwärts- und Rückwärts-Primer (V bzw. R) zur Erzeugung des Stopcodons im pMal-2X Vektor (pMal-Stop) und der Proteaseerkennungssequenzen für *Precision*-Protease (PP) und TEV-Protease (TEV) in ZO-1₅₁₆₋₈₁₂. Die durch die Primer eingefügten Mutationen sind jeweils fett gedruckt

Primersequenzen für QuickChange-Mutagenese	
pMal-Stop-V	AGG ATT TCA GAA TTC GGA TCC TGA AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC
pMal-Stop-R	GCT TGC CTG CAG GTC GAC TCT TCA GGA TCC GAA TTC TGA AAT CCT
ZO-1 ₅₁₆₋₈₁₂ PP-V	AAC AAT AAC AAC AAC CTC GGG CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GGA GAT TCT TTC TAT ATT AGA
ZO-1 ₅₁₆₋₈₁₂ PP-R	TCT AAT ATA GAA AGA ATC TCC GGG CCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG CCC GAG GTT GTT GTT ATT GTT
ZO-1 ₅₁₆₋₈₁₂ TEV-V	AAC AAT AAC AAC AAC CTC GGG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GGA GAT TCT TTC TAT ATT AGA
ZO-1 ₅₁₆₋₈₁₂ TEV-R	TCT AAT ATA GAA AGA ATC TCC GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC CCC GAG GTT GTT GTT ATT GTT

2.1.2. Expression und Reinigung der Proteine

2.1.2.1. Reinigung der MBP-Fusionsproteine

Die Bakterien wurden jeweils mit 100 µg/ml Ampicillin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht in 3-4 ml LB Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 85 mM NaCl) vorinkubiert und in 200 ml *rich*-Medium (LB Medium mit zusätzlich 10 mM Glukose) bis zu einer Absorptionsdichte (600 nm) von 0,5-08 (im Vergleich zu Wasser) bei 37 °C im Schüttelbrüter (240 U/min) angezüchtet. Anschließend wurde die Expression der auf den pMal-2cX-Vektoren liegenden Fusionsproteine durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, BioTech, St. Leon-Rot, Deutschland) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mM gestartet und die Zellen für 75-90 min bei 37 °C weiter wachsen gelassen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 x g für 8 min bei 4 °C) und das Pellet mit 4 ml Säulenpuffer SP1 (20 mM Tris pH 7,8, 200 mM NaCl und 1 mM EDTA; Merck, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert. Zur Zwischenlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -20 °C gelagert und später vorsichtig auf Eis wieder aufgetaut. Um die Degradation der Fusionsproteine zu verhindern, wurden Proteaseinhibitoren (80 µl Proteaseinhibitorcocktail [PIC], 50 µl PMSF (100 µg/ml in Ethanol), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) sowie bei den ZO-1-Konstrukten auch noch 50 µl RNase (Ribonuklease A, Roth, Karlsruhe,

Deutschland) dazugegeben. Die Zellen wurden dann mit Ultraschall (Bioblock Scientific VibracellTM, Illkirch, France) 3-5 x 15 s mit je 15 s Pause auf Eis aufgeschlossen und 2 min bei 14000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Vor dem Auftragen auf die Affinitätssäulen wurde der erhaltene Überstand mit Filtern von 0,45 µm Porendurchmesser (Minisart plus, Sartorius, Epsom, GB) von Zellbruchstücken befreit.

Für größere Mengen (z.B. Kristallisationsversuche), wurden die Mengen an Medium und Inhibitoren proportional vergrößert, aber zum Aufschließen wurde die eisgekühlte Zellsuspension 2 x bei einem Druck von 1000 PSI ($6,9 \times 10^6$ Pa) durch eine French Press-Zelle (vorgekühlt auf 4 °C, SLM Aminco[®] 20 ml; G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland) gepresst. Das Homogenat wurde bei 60 000 x g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert (Beckman Avanti TM J25/ Rotor J25.50, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) und der Überstand verwendet.

Die Zellextrakte wurden über eine eiswassergekühlte Affinitätssäule mit 5-10 ml Volumen Amylose-Resin (New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Die gebundenen MBP-Fusionsproteine wurden je 2-3 x mit den Säulenpuffern SP1 und SP2 (20 mM Tris pH 7,8; 200 mM NaCl) gewaschen. Die Proben für die Immobilisierung auf dem SPR-Sensorchip wurden zusätzlich mit SP3 (20 mM Tris pH 7,8) gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem zuletzt verwendeten Puffer, welchem jeweils 5 mM Maltose zugegeben worden waren. Für die Kristallisation wurden die Puffer leicht modifiziert. Die Pufferkapazität und Salzkonzentration müssen dort niedriger sein, damit durch Zugabe von Pufferkonzentraten leichter verschiedene Kristallisationsbedingungen eingestellt werden konnten. Anstelle der oben beschriebenen Puffer SP1 und SP2 wurden hier SP6 (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 20 mM NaCl, 1 mM EDTA) bzw. (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM NaCl) verwendet. Zur Elution diente SP5 mit 5 mM Maltose. Es wurden jeweils Fraktionen von 1-1,5 ml aufgefangen, und nach Abschätzen des Proteingehalts bei $OD_{260/280}$ wurden nur die Fraktionen mit mindestens $OD_{280} > 0,5$ (~0,5 g/ml Proteingehalt) weiter verwendet.

2.1.2.2. Reinigung der GST-Fusionsproteine

Eine Vorkultur der Bakterien erfolgte wie bei 2.1.2.1. aber die weitere Anzucht in 200 ml *rich*-Medium wurde bis zu einer Absorptionsdichte (600 nm) von 0,7-1 (im Vergleich zu Wasser) bei 28 °C (das resultierte in weniger *Inclusion Bodies* im Vergleich zur Anzucht bei 37 °C) im Schüttelbrüter (240 U/min) durchgeführt. Anschließend wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mM zugegeben und die Ansätze weitere 2-2,5 h bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C für 8 min zentrifugiert (3000 x g) und in etwa 4 ml

cold-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Zugabe von Proteinaseinhibitoren PIC und PMSF und der Zellaufschluss durch Ultraschall erfolgte wie in 2.1.2.1. beschrieben. Dann wurde 20% Triton X-100-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1% dazugegeben und 60 min auf Eis geschüttelt. Nach 20 min Zentrifugation bei 14000 x g bei 4 °C wurde der Überstand mit den GST-Proteinen bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Für die affinitätschromatographische Reinigung wurde Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben vorgequollen benutzt. Zur Elution diente 50 mM Tris-HCl pH 8 versetzt mit 10 mM frisch gelöstem reduzierten Glutathion. Wegen Eigenabsorption von Glutathion bei 260-280 nm konnte die Proteinkonzentration nicht über Absorptionsmessungen bestimmt werden. Aliquots aller Fraktionen wurden auf SDS-Gele aufgetragen und die Proteine mit Coomassiefärbung sichtbar gemacht (siehe 2.1.4). Nur die Fraktionen mit starker Färbung wurden weiterverwendet. Es zeigte sich, dass die GST-Fusionsproteine in den Elutionsfraktionen nicht für die Experimente in 2.3.3. geeignet waren, weil das zur Elution verwendete Glutathion die Bindung störte. Deshalb wurde es mit einer Entsalzungssäule (HiPrep 26/10; Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) und PBS als Laufpuffer entfernt.

2.1.2.3. Herstellung und Reinigung des selenomethioninhaltigen Occludins für die Kristallisation

Das pMal-c2x Plasmid mit dem Occludin₄₀₆₋₅₂₁-Konstrukt wurde in die methioninauxotrophen *E.coli* Zellen (B834 von M.Kolbe, MDC, Berlin) transformiert. Die Anzucht erfolgte zunächst im Minimalmedium (NMM nach Budisa et al., 1995) mit 50 mg/ml Methionin bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 8 min, 3200 x g), 3 x mit sterilem eiskaltem Wasser gewaschen und in NMM ohne Methionin bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 weitergezüchtet. Zum Einbau wurde Selenomethionin bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/ml zugegeben und die Zellen 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,3 mM IPTG erfolgte die Induktion der Proteinexpression. Die weitere Aufreinigung geschah wie in 2.1.2.1. beschrieben. Von Methionin und Selenomethionin wurden täglich frische Stocklösungen angesetzt und verbraucht.

2.1.3. Abtrennung des MBP vom Occludin für biophysikalische Untersuchungen

Im pMAL-c2X Vektor war zwischen MBP und dem einzufügenden Protein eine Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) vorhanden. Sie besteht aus den vier Aminosäuren IEGR, wobei die von Faktor

Xa bewirkte Spaltung nach dem Arginin erfolgt. Laut Herstellerangaben kann es abhängig von der Konformation (wahrscheinlich besonders in ungefalteten Proteinbereichen) zu unspezifischen Spaltungen nach basischen Aminosäuren kommen. Dies war wahrscheinlich bei MBP-ZO-1₅₀₂₋₈₁₂ der Fall, wo nach Xa-Verdau nur kleine Bruchstücke im Coomassie gefärbten SDS-Gel sichtbar waren. Die Spaltung erfolgte nach Herstellerangaben (1 µg Xa pro 50-100 µg Fusionsprotein mit 2 mM CaCl₂, 25 oder 37 °C, 16 h). Dabei wurde Xa und CaCl₂ zu affinitätsgereinigtem MBP-Occludin₄₀₆₋₅₂₁ (siehe 2.1.2.1) zugegeben. Anschließend wurde die Protease Xa mit dem spezifischen Inhibitor *Dansyl-glu-gly-arg-chloromethyl ketone* (Calbiochem, MERCK Biosciences, Bad Soden, Deutschland) deaktiviert, um weiteren unspezifischen Verdau zu verhindern. Bei den Konstrukten Occludin Δ ₄₀₀₋₅₂₁ und Occludin Δ ₄₀₆₋₅₂₁ (siehe Abschnitt 2.1.1.1) spaltete sich das MBP bei den angegebenen Bedingungen und Xa-Konzentrationen kaum ab. Um die vorhandenen Ressourcen optimal zu nutzen wurde deshalb im Weiteren nur das originale Konstrukt Occludin₄₀₆₋₅₂₁ verwendet. Die zuerst versuchte Trennung von MBP (43 kDa) und Occludin₄₀₆₋₅₂₁ (berechnet 15 kDa) mit Größenausschlusschromatographie (*Superdex 75 prep grade HR 16/60*-Säule, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) war nicht quantitativ. Etwa 80% des Occludins blieben vermischt mit MBP (Abb. 2.1).

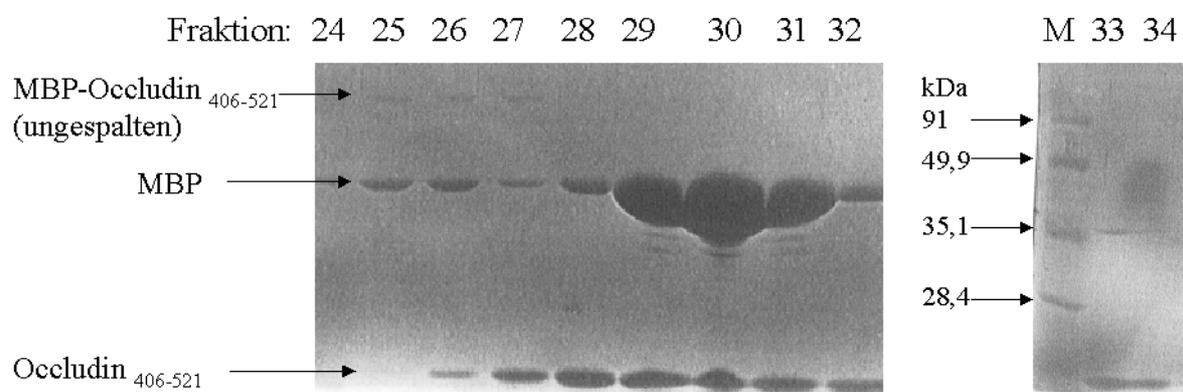


Abb. 2.1. Acrylamid-Gel (12%) der proteinhaltigen Fraktionen 24-34 der Größenausschlusschromatographie von MBP und Occludin₄₀₆₋₅₂₁. M-Molekulargewichtsmarker in kDa. Nur in den letzten Fraktionen (33-34) ist kein MBP mehr vorhanden, während in den Fraktionen 25-27 noch Spuren eines größeren Proteins (MBP-Occludin₄₀₆₋₅₂₁, was nicht vom Faktion Xa gespalten wurde) zu sehen sind. Wegen der Anzahl der Fraktionen waren mehrere SDS-Gele nötig, die möglicherweise ein etwas unterschiedliches Laufverhalten zeigten. Aus diesem Grund sind die Marker von 2. Gel nur als Orientierung für das 1. Gel zu betrachten.

Deshalb wurde versucht, MBP wieder per Affinitätschromatographie zu binden und Occludin₄₀₆₋₅₂₁ im Durchlauf aufzufangen. Dazu musste zuerst die aus der Elution stammende Maltose aus der Probenlösung entfernt werden. Dies geschah mittels Dialyse (Membran mit

3,5 kDa Ausschlussvolumen, Serva, Heidelberg, Deutschland) gegen SP5-Puffer (in etwa 2 l über 1,5 Tage mit 2-3 x Pufferwechsel). Vorher wurde die Lösung aufkonzentriert (Amicon Ultra-15, Millipore Schwalbach, Deutschland). Nach Auftragen des dialysierten Proteingemisches auf eine Amylose-Säule zeigte sich, dass etwa 10% des MBP nicht banden, sondern im Durchfluss zu finden waren.

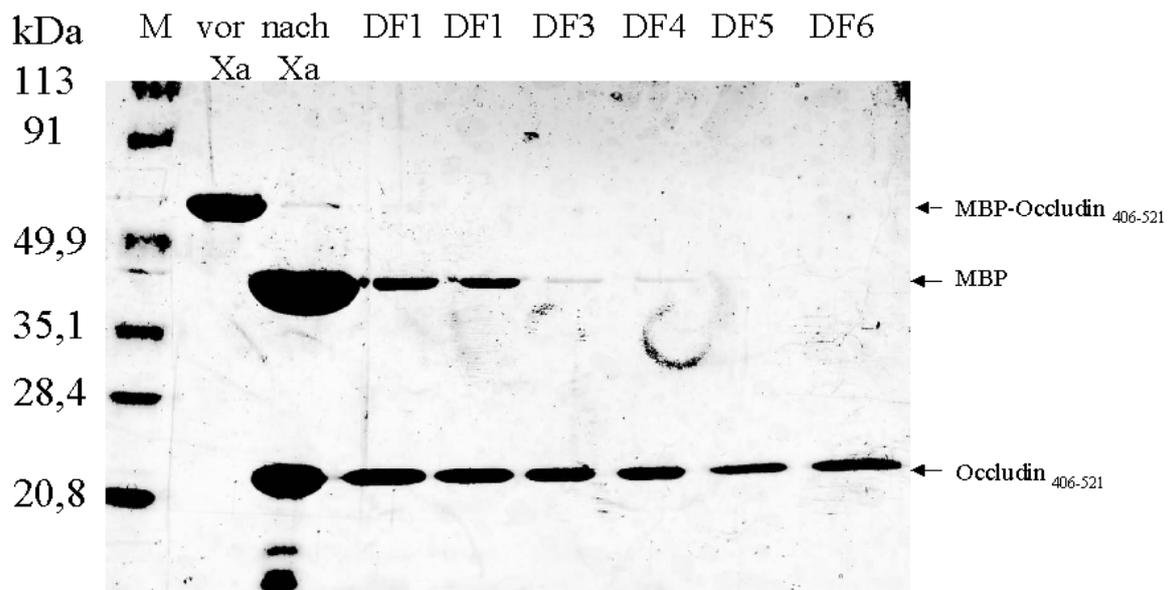


Abb. 2.2. Trennung von MBP und Occludin₄₀₆₋₅₂₁ durch Dialyse und Affinitätschromatographie. Gezeigt ist, wie sich dieselbe aufgereinigte MBP-Occludin₄₀₆₋₅₂₁-Probe durch verschiedene Behandlungen verändert. M= Molekulargewichtsmarker; vor Xa = Probe vor Spaltung mit Protease Xa; nach Xa = nach Xa-Inkubation und Aufkonzentrierung; DF1-6 sind sechs aufeinander folgende Durchflüsse derselben Probe über vier Amylose-Säulen, die zwischendurch regeneriert wurden. Das ungespaltene MBP-Occludin₄₀₆₋₅₂₁ hat eine theoretische Größe von 57,1 kDa, und zerfällt in MBP (42,5 kDa) und Occludin₄₀₆₋₅₂₁ (14,6 kDa). Das Occludinfragment zeigt nicht die erwartete Größe auf dem Gel. Dieses veränderte Laufverhalten könnte z.B. durch unvollständige SDS-Denaturation des Proteins entstehen. In der am höchsten konzentrierten Präparation (nach Xa-Spaltung und Aufkonzentration) zeigt die Probe einige kleine Abbaubrüchstücke (< 20 kDa). Der Faktor Xa besteht laut Herstellerangaben aus zwei über eine Disulfidbrücke (die bei den benutzten Bedingungen reduziert wird) verbundenen Proteinketten, die auf SDS-Gelen bei ~20 bzw. 30 kDa sichtbar sein sollten. Xa wurde aber hier im Verhältnis 1:100 zu MBP-Occludin₄₀₆₋₅₂₁ eingesetzt, was scheinbar zu wenig ist, um diese Banden sichtbar zu machen.

Durch Auftragen der dialysierten Proteinlösung über 3-4 Amylosesäulen in Serie konnte schließlich MBP quantitativ entfernt werden. Die Überprüfung der Proben mit SDS-PAGE ließ jedenfalls keine MBP-Banden mehr erkennen (Abb. 2.2). Wie effizient die Amylosesäulen waren hing u.a. davon ab, wie oft sie schon benutzt worden waren (10 x war Maximum) sowie von sorgfältiger Regeneration und Aufbewahrung bei 4 °C. Der resultierende MBP-freie Durchfluss wurde vor der weiteren Verwendung auf einen Proteingehalt von etwa 1 mg/ml aufkonzentriert.

2.1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Coomassiefärbung und Protein-konzentrationsbestimmung

Zur Qualitäts-, Reinheits- und Stabilitätskontrolle der Proteine wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) benutzt. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel modifiziert nach Laemmli (1970). Sie wurde in vertikalen Flachgelkammern (83 x 83 x 1 mm, Biorad, München, Deutschland) mit 10-15% Polyacrylamid nach den Mengenangaben in Sambrook et al., 1989 hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 bis 110 V in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris/HCL, 250 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel im Verhältnis 3:1 mit 4-fachem SDS-Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration: 50 mM Tris/HCL, pH 6,8; 100 mM DTT, 10% Glycerol, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau) und 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde *Prestained SDS-Low Range* (Biorad München, Deutschland) verwendet.

Die Gele wurden mit *Coomassie Brilliant Blue R250* gefärbt (Fairbanks, 1971). Sie wurden unter leichtem Schütteln für 30 min mit der Färbelösung (50% [v/v] Methanol; 10% [v/v] Essigsäure; 1 mg/ml Coomassie) inkubiert, mit Wasser abgespült und dann über Nacht mit Entfärbelösung (5% [v/v] Methanol; 7,5% [v/v] Essigsäure) versetzt. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Lowry (*Sigma Protein Assay Kit*: P5656; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bestimmt.

2.2. Messungen der Protein-Protein-Interaktionen mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Dazu wurde ein *BIACORE 2000* (BIACORE AB; Uppsala, Schweden) genutzt. Einer der Bindungspartner, der sogenannte Ligand, wurde kovalent an die Oberfläche eines Sensorchips (Typ CM5, BIACORE AB, Uppsala, Schweden) gebunden und mit dem in Puffer gelösten zweiten Partner (Analyt) überspült. Pro Sensorchip konnten jeweils 4 Flusszellen mit unterschiedlichen Proteinen immobilisiert werden, wobei eine immer als Leerwertkontrolle diente. Als interne Kontrolle beim Vergleich der verschiedenen Occludinkonstrukte wurde immer Occludin₄₀₆₋₅₂₁ auf eine der noch freien Flusszellen zusammen mit zwei anderen Occludinkonstrukten immobilisiert. Von der gemessenen Bindung (Messprinzip siehe Abb. 2.3. und Nagata und Handa, 2000) wird die unspezifische Bindung an diese nicht modifizierte Kontrolloberfläche abgezogen. Der Laufpuffer war die Lösung, in der die Analytproben vorlagen (SP2 mit 5 mM Maltose). Er wurde vor der Messung filtriert und entgast. Wegen der starken Temperaturabhängigkeit der SPR-Prozesse wurden alle Messungen bei 25 °C durchgeführt. Als Standardmessbedingungen wurden eine Flussrate von 8 µl/min und eine

Assoziations- bzw. Dissoziationszeit von je 4 min benutzt, wie schon in früheren Arbeiten beschrieben (Schmidt et al., 2001, 2004). Als Regenerationslösung diente anfangs 50 mM Na_2CO_3 mit 200 mM NaCl. Da diese Lösung wahrscheinlich durch Lösen von CO_2 aus der Luft ihren basischen Charakter schnell verlor, wurde später ein Gemisch von 10 mM NaOH mit 200 mM NaCl verwendet.

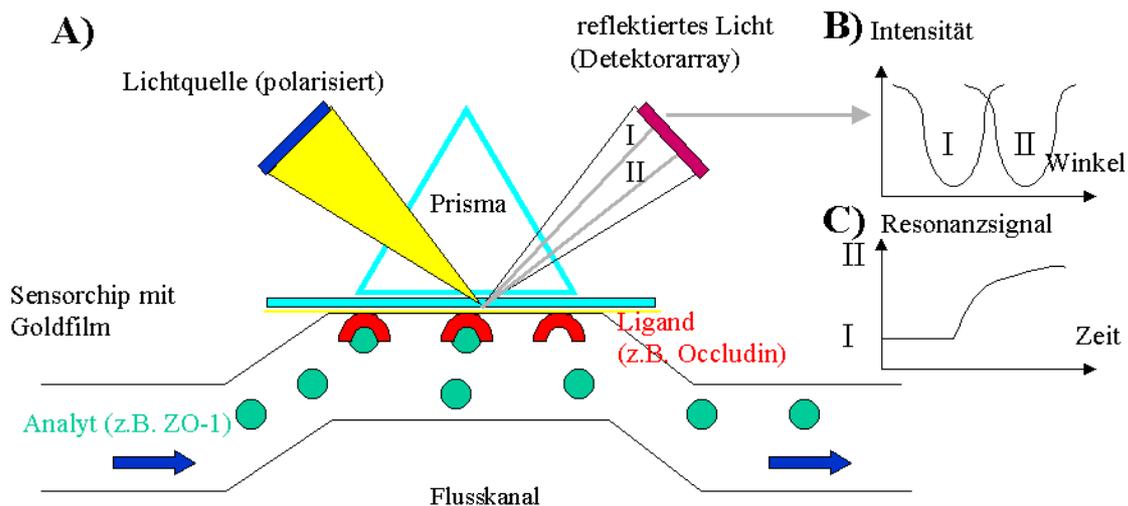


Abb. 2.3. Prinzip der SPR-Spektroskopie. **A)** Ein Bindungspartner des zu studierenden Interaktionspaars wird am Sensorchip kovalent gebunden (Ligand), während der andere Partner (Analyt) als Lösung durch den Flusskanal über die Chipoberfläche geleitet wird. Das eingestrahelte polarisierte Licht wird an der Grenzschicht zwischen Sensorchip und Lösung total reflektiert und von photoelektronischen Dioden detektiert. Unter den Bedingungen der Totalreflektion regt ein bestimmter Winkel des eingestrahelten Lichtkegels Oberflächenplasmonen in der Grenzschicht an, wenn diese mit einem Metallfilm (hier Gold, wobei die Filmdicke deutlich kleiner sein muss als die eingestrahelte Lichtwellenlänge) bedeckt ist. **B)** Die absorbierte Lichtenergie zeigt sich als eine Verringerung der Lichtintensität bei einem bestimmten Winkel im reflektierten Lichtkegel. Die aus der absorbierten Lichtenergie entstehende evaneszierende Welle reicht etwa 300 nm in die Lösung hinein und wird von der Masse, des dort befindlichen Materials beeinflusst (vereinfacht gesagt vom dort vorliegenden Brechungsindex). Binden jetzt viele Analytmoleküle an die Liganden, so verändern sich die Resonanzbedingungen und der Winkel des absorbierten Lichts verschiebt sich (von I zu II). **C)** Diese Änderung wird als Resonanzsignal aufgezeichnet. Eine Änderung des Resonanzwinkels um $0,1^\circ$ entspricht 1000 RU (*resonance units*) und korrespondiert mit einer Änderung in der Oberflächenproteinkonzentration von 1 ng/mm^2 .

Eine Methode zum Auffinden einer verbesserten Regenerationslösung wird in Abschnitt 2.2.1. einschließlich der erhaltenen Ergebnisse beschrieben. Die untersuchten MBP-Proteinkonstrukte von Occludin, α -Catenin und ZO-1 wurden in verschiedenen Kombinationen als Liganden und Analyten eingesetzt. Es zeigten sich jedoch mit Occludin und α -Catenin als Ligand sowie ZO-1 als Analyt bessere Bindungsergebnisse als im umgekehrten Fall. Deshalb wurde diese Variante verstärkt untersucht. Zur kovalenten Kopplung der Liganden dienten die COOH-Gruppen in der Dextranschicht (ca. 100 nm) des verwendeten CM5-Sensorchips. Sie wurden durch Perfusion (7 min) mit einem Gemisch aus

400 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) aktiviert. Die zu immobilisierenden Proteine wurden vor dem Einsatz umgepuffert in einen aminogruppenfreien Puffer mit einem pH-Wert, der mindestens eine pH-Einheit unter dem pI-Wert des Proteins liegt. Für die sauren Occludin- und α -Cateninkonstrukte hatte der dazu verwendete 10 mM Na-acetat-Puffer einen pH-Wert von 4, während für die ZO-1-Konstrukte pH 5 verwendet wurde. Dadurch erhalten die Proteine eine positive Nettoladung und durch ionische Interaktionen kommt es zu einer Vorkonzentrierung der Proteine innerhalb der durch die sauren COOH-Gruppen negativ geladenen Dextranschicht des Sensorchips. Durch eine im BIACORE 2000 Gerät vorhandene Applikation wurde die Reaktion der Aminogruppen der Liganden mit den von durch die EDC/NHS-Behandlung entstandenen aktiven Estern jeweils so gesteuert, dass sich eine Immobilisierungsmenge von etwa 2000 RU ergab. Das Programm war manchmal bei zu geringer Proteinkonzentration nicht erfolgreich. In diesem Fall wurde abhängig von Testmessungen das Protein 5-20 min perfundiert. Die erhaltenen Immobilisierungsmengen waren dann aber nicht so genau steuerbar. Bei einem zu geringen Wert wurde erneut das Protein perfundiert, so dass ebenfalls Mengen von ~2000 RU erreicht wurden. Eine Beladungsdichte von 1000-2000 RU erwies sich als optimal für die hier durchgeführten Messungen. Geringere Werte ergaben nur schwache schlecht auswertbare Messsignale, während es bei höheren Werten laut Herstellerangaben zu sterischen Behinderungen und damit zum Verfälschen der Messwerte kommen kann. Die ungebundenen Ester wurden durch 7-minütige Perfusion von 1 M Ethanolamin (mit HCL auf pH 8,5 eingestellt, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) abgesättigt. Die Chipoberfläche wurde jetzt für mindestens 1 h mit Laufpuffer (Flussrate 5 μ l/min) equilibriert. Vor Beginn der eigentlichen Bindungsmessungen wurde der Chip noch 5 x 1 min mit Regenerationslösung behandelt. Dabei sank das beobachtete Immobilisierungsniveau meist nochmals um ~10% jedoch in einigen Fällen noch deutlich mehr (bis zu 40%). Anschließend war die Chipoberfläche aber für mehrere Wochen stabil und veränderte sich in den folgenden Mess-Regenerations-Zyklen nur noch geringfügig. Ein Beispiel für das Aussehen der SPR-Bindungskurven ist in Abb. 3.18 zu finden.

2.2.1. Suche nach einer verbesserten Regenerationslösung für die SPR-Messungen

Um möglichst viele Messungen mit den SPR-Sensorchips durchführen zu können, ist es essentiell, deren Oberflächen nach jedem Bindungsvorgang effektiv zu regenerieren. Dabei muss die Regenerationslösung mehrere Bedingungen erfüllen. Sie soll die gebundenen Analyten schnell und effizient vom Chip lösen, darf dabei aber nicht den kovalent

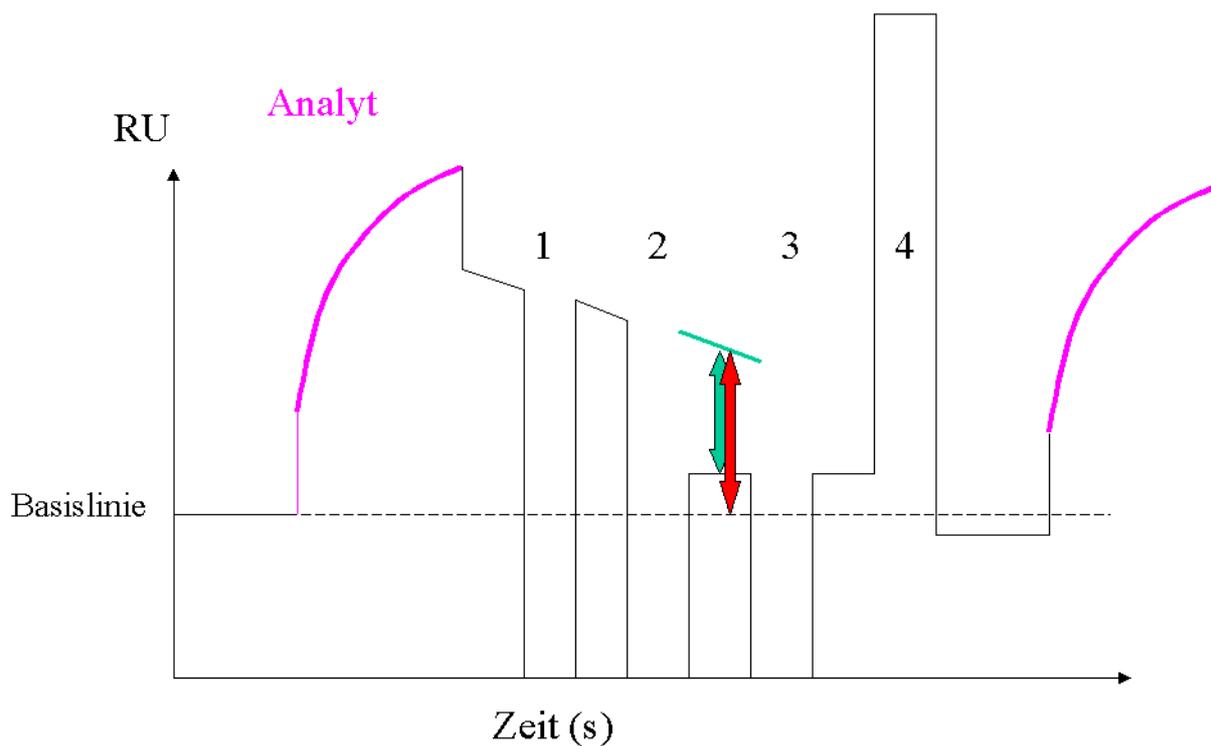
gebundenen Analyten deaktivieren oder abtrennen. Noch schlechter wäre es, wenn der Chip oder sogar das BIACORE-Gerät von den verwendeten Chemikalien angegriffen würde.

Tabelle 2.5. Für die Suche nach einem besseren Regenerationsmittel des SPR-Chips verwendete Ausgangslösungen (modifiziert nach Andersson et al., 1999).

Abk.	Eigenschaften der Lösung	Bestandteile
A	sauer, mit 4 M NaOH auf pH 5,0 eingestellt	je 0,15 M H ₃ PO ₄ , Essigsäure und Malonsäure
B	basisch, mit 2 M HCl auf pH 9,0 eingestellt	je 0,20 M Ethanolamin, Na ₂ HPO ₄ und Glycin
C	chelatierend	20 mM EDTA
D	Gemisch von Detergenzien	je 0,3% (w/w oder v/v) Tween 20 und Triton-X-100
I	hohe Ionenstärke + chaotropische Substanzen	MgCl ₂ (1,83 M), Harnstoff (0,92 M) und Guanidin-HCl (1,83 M)
U	Gemisch von unpolaren Lösungsmitteln	zu gleichen Teilen aus DMSO, Ethanol, Acetonitril und 1-Butanol

Die bei den anfänglichen Versuchen benutzte Regenerationslösung (50 mM Na₂CO₃ mit 200 mM NaCl) war besonders bei den stark bindenden Konstrukten nicht ausreichend für eine vollständige Regeneration der SPR-Sensorchips. Deshalb wurde eine in der Literatur aufgezeigte Methode zum Auffinden einer verbesserten und auf das eigene Interaktionssystem maßgeschneiderte Regenerationslösung verwendet (Andersson et al., 1999). In dem Artikel wurden aufgrund von Literaturstudien sechs unterschiedliche Grundeigenschaften von Regenerationslösungen gefunden und für die Anwendbarkeit auf bestimmte Antigen-Antikörper-Interaktionen untersucht. Da schon früher festgestellt wurde, dass Mischungen verschiedener Lösungen die Regeneration verbessern können, wurden von der Andersson-Gruppe auch Gemische der Grundeigenschaften getestet. Die dort beschriebenen Prinzipien sind auch für die hier studierte Protein-Protein-Interaktion von Occludin und ZO-1 anwendbar. Es wurden sechs Stocklösungen mit den angegebenen Eigenschaften (etwas modifiziert im Vergleich zu den Angaben im Artikel aufgrund mangelnder Verfügbarkeit einiger Chemikalien) erzeugt, und einzeln oder im Gemisch auf ihre Regenerationsfähigkeit der Occludin-ZO-1-Bindung untersucht.

Auf den für die Regenerationssuche benutzten Sensorchips waren die drei Occludinkonstrukte⁴⁰⁶⁻⁵²¹, ⁴³⁴⁻⁵²¹ und ³⁷⁸⁻⁵²¹ mit je knapp 10000 RU kovalent gebunden. Durch diese hohe Beladungsdichte waren die Bindungsmengen der Analyten und die Effekte der verschiedenen Regenerationslösungen besonders deutlich. Darüber wurde als Analyt ZO-1⁵⁸⁹⁻⁸¹² gegeben (10 min bei 2 µl/min). Vor Beginn der Regenerationstests wurde mindestens 5 min Laufpuffer perfundiert, um die schnell dissoziierenden Analytanteile zu entfernen. Anschließend wurden die Regenerationslösungen (einzeln mit 2 Teilen Wasser z.B. Aww oder als Gemisch zweier Lösungen mit 1 Teil Wasser z.B. ABw) getestet (je bei einer Flussrate von 20 µl/min für 30 s) wie in Abb. 2.4 beschrieben.



$$\text{Regenerationseffekt in \%} = \frac{\text{Analytverlust}}{\text{Analytlevel}} \cdot 100$$

Abb. 2.4. Schema eines SPR-Sensorgramms mit Darstellung der für die Berechnung des Regenerationseffektes verschiedener Lösungen (hier 1-4 genannt) (nach Andersson et al., 1999) wichtigen Parameter. Zuerst wurde der Analyt an den SPR-Sensorchip gebunden (magenta). Nach dem Ende der Injektion dissoziiert ein Teil der gebundenen Moleküle schnell, aber dann zeigt sich bei starken Bindern eine nur noch schwach abfallende Messkurve. Jetzt werden die zu testenden Regenerationslösungen jeweils mit standardisierten Zeiten und Mengen injiziert. Die Lösungen 1 und 3 verändern die extrapolierte Dissoziationskurve kaum und sind also unwirksam zur Regeneration der Chipoberfläche. Nach Zugabe der Lösung 2 zeigt sich ein deutlicher Verlust der noch vorhandenen Analytmenge (grüner Pfeil) im Vergleich zu einer ungestörten Dissoziation (extrapolierte grüne Linie). Die Regenerationseffizienz wird als prozentuales Verhältnis von Analytverlust und theoretischen gesamten Analytlevel ohne die Regeneration (roter Pfeil) angegeben. Im Fall 4 (positiver RU-Sprung durch hohen Brechungsindex der entsprechenden Lösung) fiel die Messkurve unter die Basislinie. Das ist nicht auswertbar und die entsprechende Lösung wurde noch einmal bei einem höheren Analytausgangslevel getestet. Sank der verbleibende Analytlevel unter 30% des Wertes nach der anfänglichen Dissoziation, wurde neuer Analyt injiziert (rechts).

Die Lösungen sollten in einer zufälligen Reihenfolge eingesetzt werden, um mögliche Verzerrungen der Ergebnisse durch mehrfaches Verwenden der gleichen Komponente zu vermeiden. Die Regenerationseffizienz wurde so berechnet, dass ein abnehmendes Analytniveau einen negativen Wert ergibt (Tabelle 2.6). Die besten Einzellösungen waren Iww, Dww und Cww. Sie wurden deshalb nochmals als mögliche Dreiergemische untersucht (Tabelle 2.7). Gemische mit der Lösung U zeigten hingegen sogar ansteigende RU-Werte im Sensorgramm und deshalb positive Regenerationswerte. Das weist darauf hin, dass sich diese unpolaren Lösungsmittel gar nicht zur Regeneration der Occludin-ZO-1-Bindung eignen.

Tabelle 2.6. Regenerationseffizienz verschiedener Regenerationslösungen. Dargestellt ist die gemittelte Regenerationseffizienz von 3 Messungen der Regeneration der Bindung von ZO-1₅₈₉₋₈₁₂ an drei verschiedene Occludinkonstrukte. Zum Vergleich wurde die alte Regenerationslösung (50 mM Na₂CO₃ mit 200 mM NaCl) und davon eine 1:3 Verdünnung unter gleichen Bedingungen getestet.

Gemisch	Occludin 406-521		Occludin 434-521		Occludin 378-521	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Aww	1,5	0,5	4,8	2,8	3,1	0,4
Bww	-0,7	1,1	-2,5	1,4	2,8	1,1
Cww	-4,1	1,6	-6,9	1,4	-1,0	3,0
Dww	-9,8	8,4	-18,5	16,1	-9,3	14,9
Iww	-29,5	6,1	-40,3	11,3	-25,4	5,9
Uww	23,5	9,3	53,8	18,1	14,7	2,4
ABw	-0,5	0,3	-0,8	1,4	0,5	1,3
ACw	0,0	0,1	1,2	0,1	-0,2	0,5
ADw	7,7	3,4	14,3	6,9	12,8	4,3
Alw	-9,7	4,3	-19,7	7,3	-1,3	6,2
AUw	36,4	10,3	88,6	70,8	44,3	21,4
BCw	-1,1	0,6	-1,5	0,8	-0,5	0,5
BDw	-7,0	3,2	-27,7	19,6	-5,3	5,3
DCw	-7,8	1,4	-20,6	3,9	-4,9	0,9
DUw	82,6	75,4	466,9	267,9	113,8	104,5
CIw	-6,5	4,0	-20,8	11,9	-2,5	5,2
DIw	-29,6	9,1	-69,0	11,8	-20,4	11,6
CUw	-10,1	1,9	-62,1	22,2	2,2	0,4
1/3 Na ₂ CO ₃	-31,4	2,8	-40,7	7,1	-29,9	2,8
Na ₂ CO ₃	-34,0	10,3	-34,7	6,3	-29,5	6,6

Tabelle 2.7. Regenerationseffizienz von Mischungen der besten drei Einzellösungen von Tabelle 2.6. Je Mittelwerte und SEM von zwei Regenerationen der Bindung von ZO-1₅₈₉₋₈₁₂ an drei verschiedene Occludinkonstrukte.

Gemisch	Occludin 406-521		Occludin 434-521		Occludin 378-521	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
CCD	-5,5	1,6	-10,6	1,9	-4,1	0,0
CCI	1,3	8,8	-5,2	18,6	4,7	8,3
CDD	-7,9	0,8	-12,8	1,0	-2,4	0,9
CDI	5,7	3,9	4,5	3,6	11,6	4,6
CII	-0,6	13,4	-8,4	12,8	3,0	16,2
DDI	-21,4	1,1	-27,8	1,8	-8,8	3,6
DII	-62,1	0,7	-70,0	0,6	-53,3	0,1

Laut den Ergebnissen in Tabelle 2.7. ist eine Mischung aus einem Teil Lösung D und zwei Teilen der Lösung I die beste Regenerationslösung für das untersuchte System. Die SEM-Werte zeigen zwar zum Teil deutliche Schwankungen aber die Trends waren reproduzierbar, sowohl bei Wiederholungen mit dem gleichen Analyt als auch mit dem noch stärker bindenden ZO-1₅₈₉₋₇₇₂. Bei späteren Messungen zeigte sich eine aufeinanderfolgende Injektion von DII und der anderen Regenerationslösung (10 mM NaOH mit 200 mM NaCl)

als teilweise noch effizienter, um starke Bindungen aufzulösen, als die Verwendung nur einer Lösung.

2.2.2. Auswertung der SPR-Messergebnisse

Als Standardmessbedingungen wurden eine Flussrate von 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ und eine Assoziations- bzw. Dissoziationszeit von je 4 min benutzt. Eine kinetische Analyse der SPR-Daten unter der Annahme einer homogenen 1:1-Assoziation zwischen Occludin/ZO-1 bzw. α -Catenin/ZO-1 und (Langmuir-Bindungsmodell: $A+B \rightleftharpoons AB$) ergab keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen den theoretischen und experimentellen Kurven. Die vom Gerätehersteller angegebenen möglichen Ursachen für eine solche Kurvenabweichung (Massentransportlimitierung, Myszka et al., 1997, 1998; Wiederbindung des Analyten in der Dissoziationsphase, Morton et al., 1995; Nieba et al., 1996; sterische Behinderungen bei zu starker Immobilisierung von Liganden) konnten ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Immobilisierungsniveaus reduziert, ausreichend hohen Flussraten bei der Messung verwendet und nur ausgewählte Bereiche der Messkurven bei der Auswertung einbezogen. Bei den nach der Optimierung standardmäßig benutzten Bedingungen (~ 2000 RU immobilisierter Ligand, Flussrate 8 $\mu\text{l}/\text{min}$) spielten diese Effekte bei unseren Messungen keine Rolle. Andere experimentelle Daten weisen darauf hin, dass die ZO-1-Fragmente in Lösung miteinander oligomerisierten, was zu einer unkalkulierbaren 1:N-Interaktion führte. Analysen der Bindung von Occludin₃₇₈₋₅₂₁ an Peptide aus ZO-1 (wo diese Oligomerisierungsprobleme nicht vorhanden sind und gute Kurvenanpassungen für eine 1:1-Interaktion vorliegen) deuten auf submikromolare Bindungskonstanten hin (Schmidt, 2002). Um wenigstens relative Unterschiede zwischen einzelnen Konstrukten zu bestimmen, wurde die Stärke des Resonanzsignals verschiedener ZO-1-Konstrukte unter Standardbedingungen gemessen. Da die SPR-Signalstärke nur von der am Sensorchip gebundenen Gesamtmasse an Protein aber nicht von der Aminosäuresequenz abhängt, galt für jedes Proteinkonstrukt $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng}/\text{mm}^2$. Die so bestimmte gebundene Masse wurde mit der aus der Sequenz bekannten molaren Masse zur Berechnung der molaren Bindung (in fmol) jedes Konstrukts an den Sensorchip benutzt. Der Vergleich der Messergebnisse verschiedener Chips ist nicht trivial, da man bei der chemischen Kopplung der Liganden (selbst mit einem geräteinternen Hilfsprogramm) nie exakt die gleiche Immobilisierungsmenge erhält. Außerdem sind die gekoppelten RU-Werte proportional die der Masse, während die Bindung anhand der molaren Stoffmenge erfolgt. Um die Werte zwischen unterschiedlichen Chips vergleichen zu können, wurde jeweils die RU-Menge an kovalent gebundenem Ligand auf dem Chip (abzüglich der Immobilisierung durch EDC/NHS und Ethanolamin auf der Blankflusszelle) berechnet. Aus

den AS-Sequenzen der Konstrukte wurden die molaren Massen (M) ermittelt und aus den gebundenen RU-Werten (m) die jeweils gebundenen Stoffmengen (n) errechnet ($n=m/M$). Die so bestimmten Ligandenbeladung wurde zu einer Standardligandenbeladung von 100 fmol in Beziehung gesetzt. Mit dem sich daraus ergebenden Korrekturfaktor wurden auch die analog ermittelten Bindungswerte (in fmol) der Analyten multipliziert. Es ergeben sich also immer Bindungswerte der Analyten zu einer extrapolierten Ligandenbeladung von 100 fmol. Dieses Umrechnen erlaubt auch eine Abschätzung, wie stark die Liganden bei einer gegebenen Analytkonzentration abgesättigt sind. Bei einer 1:1-Interaktion und voller Sättigung müssten an 100 fmol Ligand auch 100 fmol Analyt binden. Selbst bei den höchsten in der Messung eingesetzten Konzentrationen (10 μ M) lagen die Werte meist unter 30 fmol für die Analytbindung und nur bei sehr guten Bindern wie ZO-1₅₁₆₋₈₁₂ an Occludin₄₀₆₋₅₂₁ wurden Werte von 50 fmol erreicht. Bei diesen Berechnungen muss man aber auch noch einbeziehen, dass ein unbekannter Prozentsatz der Ligandenmoleküle durch die ungerichtete Immobilisierung sterisch für eine Bindung nicht zugänglich oder durch Denaturierung zerstört ist. Diese Ligandenmoleküle erzeugen immer noch ein RU-Signal, aber tragen nicht mehr zur Analytbindung bei.

Für alle SPR-Messungen wurden immer MBP-Fusionskonstrukte verwendet. Zur Kontrolle ob MBP die Bindungen beeinflusst, wurde reines MBP sowohl als Ligand als auch als Analyt genutzt. Bei immobilisiertem MBP kam es zu einer unspezifischen Bindung, die aber wahrscheinlich an die Dextrane der Chipoberfläche direkt erfolgte. Reines MBP in Lösung zeigte jedenfalls keine Bindung an Occludin, α -Catenin oder ZO-1. Die Bindung verschiedener α -Catenin-Konstrukte und Occludin₄₀₆₋₅₂₁ an immobilisiertes α -Catenin₅₀₉₋₉₀₆ und Occludin₄₀₆₋₅₂₁ war nur jeweils sehr schwach und wahrscheinlich nicht signifikant. Eine Homoassoziation von Occludin bzw. α -Catenin ist also mit SPR nicht sichtbar. Die Bindung der 1. Hälfte von α -Catenin an sich selbst, die schon als Assoziationsbereich beschrieben wurde (Pokutta und Weis, 2000), ist jedoch nicht untersucht worden. Deutlich stärkere und damit wahrscheinlich signifikante Bindungen gibt es jedoch mit verschiedenen ZO-1-Konstrukten an ZO-1₅₀₂₋₈₁₂.

2.3. Identifikation von an der Occludin/ZO1- bzw. α -Catenin/ZO-1-Bindung beteiligter Peptidepitope

2.3.1. Synthese der Peptide auf Membranen

Um die Bindungsepitope von Occludin, α -Catenin und ZO-1 genauer zu untersuchen, wurden die vermuteten Bindungssequenzen durch SPOT-Synthese (Frank, 2002) punktförmig an eine Zellulosemembran (Whatmann 50, Maidstone, England) mit Hilfe eines multiplen Peptidsyntheseroboters (Abimed, Langenfeld, Deutschland) gekoppelt (Kooperation mit M. Portwich, Charité, Berlin; Kramer und Schneider-Mergener, 1998). Um sterische Probleme bei der späteren Bindung der Interaktionspartner an die Membran zu vermeiden, wurden jeweils erst zwei β -Alaninmoleküle an die Membran gekoppelt. Anschließend folgten die individuellen Aminosäuresequenzen ausgehend vom C-Terminus. Die getrockneten Membranen wurden dann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor den Messungen wurden sie 2 min mit Dimethylacetamid und 2 x 2 min in Ethanol behandelt, um die Peptide in den Spots wieder besser für die folgenden Lösungen zugänglich zu machen, und danach 3 x 10 min in TBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 40 mM Tris/HCl, pH 8) gewaschen. Zur Unterdrückung unspezifischer Proteinbindungen an die Zellulose wurden die Membranen über Nacht mit einem Blockierungspuffer [hergestellt aus 10 x Peptidkonzentrat (B6429, Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland) in TBS mit 5% Saccharose] inkubiert. Näheres zu Methoden siehe auch Schmidt et al., 2004. Nach den Messungen wurden die Membranen mit einem Regenerationspuffer (6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% SDS) bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1-2 h inkubiert, mit 5 x *aqua dest.*, 2 x Ethanol und 1 x Diethylether gewaschen, an der Luft getrocknet und letztlich wieder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. So standen sie für weitere Messungen zur Verfügung.

In lyophilisierter Form wurden ebenfalls die Peptide ZO-1₅₉₇₋₆₃₃, ZO-1₇₂₉₋₇₄₃ und ZO-1₇₄₅₋₇₇₂ mit einer N-terminalen Erweiterung von zwei β -Alaninen und einem Cystein für spätere Kopplungen hergestellt (Kooperation mit M. Portwich, Peptidgruppe J. Schneider-Mergener, Charité, Berlin). Dazu wurde die multiple Festphasensynthese mit Fmoc-Chemie genutzt (Janek et al., 2001).

2.3.2. Herstellung von Tetramethylrhodamin-gekoppelten Peptiden und ihre Bindung an Peptidmembranen

Zuerst wurde der rote Farbstoff Tetramethylrhodamin (TMR, Molecular probes; Europe BV, Leiden, Niederlande; www.probes.com) über die bei der Synthese eingeführten N-terminalen Cysteine an die CC1, H1 und H2-Peptide (ZO-1₅₉₇₋₆₃₃, ZO-1₇₂₉₋₇₄₃ bzw. ZO-1₇₄₅₋₇₇₂) gebunden (Toepert et al., 2003). Dazu wurde eine Peptidmenge, die $50\text{ }\mu\text{M}$ in 1 ml Endvolumen ergibt,

abgewogen und in 40 μ l 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen. Um eine vollständige Reaktion zu erzielen, wurden die folgenden Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, jeweils mit einem 1,5-fachen molaren Überschuss zu ihrem im Ansatz vorhandenen Reaktionspartner dazugegeben. Zur Reduktion etwaiger oxidiertes Cysteine an den Enden der Peptide wurde der Ansatz mit Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochlorid versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Derweil wurde der Farbstoff TMR abgewogen und in 5 μ l 1N-Methyl-pyrrolidone (FLUKA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) aufgelöst (darin ist er farblos). Diese Lösung wurde dann zum Gesamtansatz gegeben (wird rot) und alles bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Wichtig für alle weiteren Schritte war, unter Lichtabschluss zu arbeiten, weil der Farbstoff lichtempfindlich ist. Am nächsten Tag wurde ein mindestens 10-facher Überschuss an Mercaptoethanol dazugegeben, um nicht reagierte Farbstoffmoleküle abzusättigen (1 h bei Raumtemperatur geschüttelt). Schließlich wurde das unverbrauchte Mercaptoethanol durch einen 3-fachen molaren Überschuss DMSO zerstört (1 h bei RT schütteln) und die Lösung bis zum Endvolumen mit Blockierungspuffer aufgefüllt. Parallel dazu erfolgte die Vorbehandlung der Peptidmembran (siehe 2.3.1). Sie wurde kurz abgetupft und zusammen mit der Farbstofflösung möglichst eng in eine Folie eingeschweißt und bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Ende der Inkubation wurde die Membran mit TBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 40 mM Tris/HCl, pH 8) gewaschen, wobei sie in regelmäßigen Abständen mit einem Farbscanner dokumentiert wurde. Bereiche, die auch nach langem Waschen noch gefärbt waren, zeigten eine starke Bindung an. Als Kontrolle wurde die Membran mit dem reinen Farbstoff versetzt, der mit Mercaptoethanol und DMSO reagiert hatte. Bei der Kontrolle wurde die Farbe innerhalb von Minuten von der Membran gewaschen, während einige Peptidpunkte nach Interaktion mit farbstoffmarkierten Peptiden über Stunden eine starke Färbung zeigten. Bis auf kleine Reste konnten durch die unter 2.3.1 beschriebene Regeneration die Farbpeptide nahezu vollständig von den Membranen entfernt werden.

2.3.3. Bindung von GST-Fusionsproteinen an Peptidmembranen

Als Bindungspartner für die Peptidmembranen wurden hier die von Glutathion gereinigten GST-Fusionsproteine (siehe 2.1.2.2) verdünnt mit Blockierungspuffer verwendet. Versuche mit Proteinlösungen, die noch Glutathion enthielten waren erfolglos. Die vorbehandelten Membranen (siehe 2.3.1) wurden mit 200 nM GST-Occludin₄₀₆₋₅₂₁ oder GST- α -Catenin₅₀₉₋₉₀₆ in Folie eingeschweißt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 3 x 10 min mit TBS gewaschen und für 90 min mit anti-GST-Antikörpern inkubiert, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt waren (1:1000 in TBS; Amersham Bioscience, Freiburg,

Deutschland). Nach erneutem Waschen mit TBS (3 x 10 min) wurden die gebundenen GST-Fusionsproteine mit einem Chemilumineszenzkit (Uptima; Interchim, Montiucon Cedex, France) unter Benutzung des Lumi-Imager F1™ (Boehrtinger, Mannheim, Deutschland) innerhalb von 2-10 min detektiert (Schmidt et al., 2004).

2.4. Generierung der Homologiemodelle und verwendete bioinformatische Methoden

2.4.1. Sequenzvergleiche und Sequenzanalysen

Wenn nicht anders angegeben, wurden immer die Sequenzen der entsprechenden Proteine aus der Maus (*Mus musculus*) verwendet; auch die angegebenen Aminosäure-Nummern leiteten sich von den Mausequenzen ab. Für die Sequenzvergleiche und Sequenzalignments wurde das Programmpaket SEQLAB (*genetic computer group* [GCG] Wisconsin *package*, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) benutzt. Es besteht aus über hundert Einzelprogrammen zum Vergleich und Analyse von Aminosäure- und DNA-Sequenzen. Die in den Ergebnissen genannten Sequenzähnlichkeiten wurden ebenfalls mit diesem Programmpaket berechnet. Dazu wurden zwei Sequenzen vom Programm über einer Scoring-Matrix in Beziehung gesetzt. Die Anzahl identischer Aminosäuren zwischen den beiden verglichenen Sequenzen im Verhältnis zur AS-Menge der gesamten Sequenz ergibt dabei die Sequenzidentität. Bei der Berechnung der Sequenzähnlichkeit werden zusätzlich zu den identischen noch die stark ähnlichen Aminosäuren (z.B. D und E) mitberücksichtigt. Die Angabe von Sequenzidentität und -ähnlichkeit erfolgt in Prozent. Es gibt viele verschiedene solcher Matrices, welche Aminosäuren nach divergierenden Kriterien und nach unterschiedlicher Stärke als ähnlich betrachten. Deshalb können die mit unterschiedlichen Matrices berechneten Sequenzähnlichkeiten derselben Sequenzen etwas voneinander abweichen. Wenn nicht anders genannt, wurde in dieser Arbeit die Matrix *blossum62* verwendet.

Für die Vorhersage der Sekundärstruktur von Aminosäuresequenzen wurde das Internetprogramm JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) benutzt. Es verwendete mehrere Unterprogramme und generierte daraus eine Konsensussequenz. Für die Analyse von Coiled coil(CC)-Eigenschaften wurden die Programme COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html; basierend auf einem Algorithmus von Lupas et al., 1991, 1996b) COILSCAN aus dem GCG-Programmpaket und MATCH (<http://cis.poly.edu/~jps/>; Fischetti et al., 1993) benutzt. Die Vorhersageprogramme für CC-Eigenschaften benutzten bekannte CC-Sequenzen als Lernset und suchten dann nach ähnlichen Eigenschaften in den zu untersuchenden Sequenzen (Lupas et al., 1997). Das Programm COILS basierte auf der MTIDK-Matrix, die CC-Sequenzen aus Myosinen, Tropomyosinen, Intermediärfilamenten, desmosomalen Proteinen und Kinesinen als

Ausgangspunkt für die CC-Vergleiche verwendet. Laut Angabe der Autoren dieses Programms ist diese Matrix gut geeignet, relativ kurze CC-Sequenzen in globulären Proteinsequenzen vorherzusagen. Das traf auf die uns interessierenden Proteine Occludin, α -Catenin und ZO-1 zu. Zusätzlich fand eine Option Verwendung, mit der die CC-Positionen a und d in der Sequenz bei der Vorhersage 2,5-fach übergewichtet werden konnten. Geht die vom Programm berechnete CC-Wahrscheinlichkeit gegenüber den ungewichteten Werten dabei deutlich zurück, ist dies ein Zeichen für falschpositive CC-Vorhersagen in ladungsreichen Aminosäuresequenzen. Das Programm MATCH ordnete die Aminosäuren der eingegebenen Sequenz den sieben Positionen (a-g) des CC-Heptadmotivs zu, jedoch ohne eine CC-Wahrscheinlichkeit zu berechnen. Die anderen beiden Programme (COILSCAN, COILS) erlaubten eine Suche nach CC-Eigenschaften mit Sequenzlängen von 14, 21 oder 28 AS, was 2, 3 bzw. 4 Heptads entspricht. Mit den verschiedenen Suchlängen werden unterschiedlich lange CC-Helices erkannt, und es wurde jeweils eine Wahrscheinlichkeit errechnet. Ist diese größer als 50%, wurde die erkannte Helix als signifikante CC-Helix behandelt. Ein Teil der erhaltenen Analysen ist schon in Schmidt et al., 2004 publiziert.

2.4.2. Das Erzeugen der Homologiemodelle

Dieser Methode liegt die Beobachtung zugrunde, dass ähnliche Sequenzen auch ähnliche Proteinstrukturen ausbilden (siehe 1.3.2). Man versucht also zu dem gewünschten Zielprotein eine sequenzähnliche bekannte Proteinstruktur zu finden und darauf basierend ein Modell für die Struktur des Zielproteins zu entwickeln. Dies war ein stufenweiser Prozess, wobei einige Schritte mehrmals durchlaufen wurden, bis ein optimales Modell generiert worden war. Die in der Einleitung allgemein beschriebenen Schritte sind im Folgenden samt den benutzten Programmen näher erläutert. Die gefundenen Strukturvorlagen und Modelle für Occludin, α -Catenin und ZO-1 sind bei den Ergebnissen ausführlich beschrieben (zum Folgenden siehe auch Bourne und Weissig, 2003). Das wichtigste dabei verwendete Programm, was die meisten der unten beschriebenen Funktionen enthält, war SYBYL 6.8. mit dem Erweiterungsmodul "Biopolymer" von Tripos Inc. (St. Louis, USA).

Schritt 1: Suche einer Strukturvorlage in der PDB und erstes grobes Alignment

Zur Auswahl geeigneter Strukturvorlagen für die Homologiemodelle wurde die Protein-Datenbank (PDB, Berman et al, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>) herangezogen. Darin sind alle veröffentlichten Proteinstrukturen enthalten. Mit dem Programm FASTA, für schnelles Alignment, wurde nach Sequenzähnlichkeiten zwischen den vorhandenen 3D-Strukturen in der PDB und den Mausproteinen Occludin (Swissprot-Zugangsnummer: Q61146), ZO-1

(P39447) und α -Catenin (P26231) gesucht. Die gefundenen Strukturvorlagen umfassten meist nicht den ganzen Sequenzbereich der späteren Modelle, sondern die verschiedenen sequenzähnlichen Fragmente mussten noch zum Gesamtmodell verbunden werden. Das erste grobe Alignment wird gleich vom FASTA-Suchprogramm erstellt.

Schritt 2: Alignmentkorrektur

Es ist hilfreich zu wissen, welche Bereiche der Zielstruktur in verwandten Sequenzen konserviert oder variabel sind. Konservierte Bereiche sind höchstwahrscheinlich strukturell und funktionell wichtig und werden deshalb in der Strukturvorlage an ähnlicher Stelle liegen. Variable Bereiche sind oft Loopregionen mit höherer Wahrscheinlichkeit für Insertionen oder Deletionen. Mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994) wurden deshalb multiple Alignments der Sequenzen der Zielproteine aus mehreren Spezies erstellt. Diese Alignments wurden mit den Sequenzen der unter Schritt 1 gefundenen Strukturvorlagen abgeglichen. Es wurde besonders darauf geachtet, ob die Zielsequenzen in strukturell wichtigen Bereichen (z.B. die β -Faltblätter im Inneren der SH3- und GUK-Domäne von ZO-1, oder bei langen Helices) mit den Sequenzen der Strukturvorlagen übereinstimmen. Eine A \Rightarrow E Mutation, wo der hydrophile Glutamatrest ins Proteininnere zeigt, ist z.B. sehr unwahrscheinlich. Hier müssen die Aminosäuren im Alignment dann anders angeordnet werden. Bereiche von Deletionen oder Insertionen sollten im strukturellen Alignment möglichst in Loopregionen liegen.

Schritt 3: Erzeugung des Proteinrückrads

Für die im Alignment aus Schritt 2 als ähnlich gefundenen Bereiche erfolgte jetzt der Austausch der Aminosäuren der Strukturvorlage gegen die des Zielproteins. Dabei wurden nur Aminosäureseitenketten ausgetauscht, während die Konformation des Proteinrückrads erhalten blieb. Falls für verschiedene Bereiche der Zielsequenz unterschiedliche Strukturvorlagen mit jeweils guter Sequenzidentität gefunden worden waren, wurden sie an diesem Punkt möglichst günstig gegeneinander positioniert und miteinander verknüpft (z.B. die zwei Bestandteile des Occludinmonomermodells (Abb.3.9)). Für Bereiche größerer Sequenzabweichungen zwischen der Zielsequenz und der Strukturvorlage (z.B. Hinge- und GMP-Bindungsregion in ZO-1) wurden in der PDB überlappende sequenzähnliche strukturelle Fragmente gesucht und in das Modell eingebunden. Nach einem ähnlichen Prinzip operiert auch der ROSETTA-Algorithmus (Simons et al., 1999). Für einige Bereiche, wo keine passende Strukturvorlage gefunden werden konnte, half die

Sekundärstrukturvorhersage weiter. Diese Bereiche wurden dann im Programm entsprechend aufgebaut als Helix bzw. β -Strang.

Schritt 4: Modelling der kleinen Loops

Es gab etliche Fälle von Lücken im Alignment entweder in der Zielsequenz (Deletionen) oder in der Strukturvorlage (Insertionen). Im ersten Fall wurden die überschüssigen Aminosäuren der Strukturvorlage gelöscht womit eine Lücke entstand. Im zweiten Fall musste das Proteinrückrad der Strukturvorlage aufgeschnitten und die überzähligen Aminosäuren eingefügt werden. Beide Fälle bedeuten eine Änderung der Konformation des Proteinrückrads. Veränderungen in Helices oder β -Strängen sind schwierig, so dass man solche Lücken in Schritt 2 in Loopbereiche bringen sollte. Änderungen in Loopkonformationen sind beim Erzeugen von Homologiemodellen immer schwer vorherzusagen, da auch ohne Deletionen oder Insertionen die Konformation von Loops zwischen Zielprotein und Strukturvorlage aus den folgenden Gründen oft differiert:

- a) Loops an der Oberfläche sind häufig an Kristallkontakten beteiligt, die zwischen Zielprotein und Strukturvorlage oft sehr verschieden sein können. Die Form des Loops in einer Röntgenkristallstruktur kann also dadurch schon von der Form des Loops in Lösung (z.B. NMR-Struktur) abweichen.
- b) Wird eine kleine gegen eine große Aminosäure ausgetauscht, kann der größere Platzbedarf der neuen Seitenkette den Loop wegdrücken.
- c) Mutationen von Loop-AS zu Prolin oder von Glycin zu jeder anderen Aminosäure führt zur Einengung des möglichen Konformationsraums im Ramachandran-Plot, was meist mit einer Konformationsänderung des Loops einhergeht.

In Lösung sind Loops und auch ganze Proteine nicht starr, sondern immer im gewissen Maße flexibel. Für das Modellieren der Loops gibt es zwei Ansätze:

1. Wissensbasiert : Die PDB wird nach bekannten Loops mit passenden Endpunkten und ähnlicher Sequenz für die einzusetzenden Aminosäuren durchsucht und die Strukturinformation in das Modell kopiert. Alle großen Modellingprogramme haben diese Funktion. Bei unseren Modellen wurde hier die "Loopsearch"-Funktion des Programms SYBYL genutzt.
2. Energiebasiert: Dabei wird eine *ab initio* Vorhersage der Loopfaltung unter Verwendung einer Energiefunktion benutzt.

Für kurze Loops von 5-8 Aminosäuren liefern die genannten Methoden eine gute Chance für die Vorhersage einer Loopkonformation, die nahe der wahren Konformation liegt.

Schritt 5: Modelling der Seitenketten

Die Lage der Seitenketten des Zielproteins ist bei hoher Sequenzidentität (>35%) oft identisch mit der Strukturvorlage, so dass man die Torsionswinkel der C α -C β -Bindung übernehmen kann. Ansonsten kann man auf Rotamerbibliotheken zurückgreifen, die aus Strukturen mit hoher Auflösung abgeleitet wurden. In Fällen, in denen das Proteinrückrad möglicherweise nicht ganz korrekt vorhergesagt wurde (z.B. in Loops nach Schritt 4), leidet natürlich auch die Vorhersagegenauigkeit der Rotamere der betroffenen Seitenketten. Seitenketten, die sich im Modell zu nahe kommen oder sogar überlappten, wurden in andere Positionen gedreht.

Schritt 6: Optimieren des Modells

Dies erfolgt durch Energieminimierung und Moleküldynamik des Modells. Die erhaltenen Modelle wurden mit einem AMBER 4.1-Kraftfeld minimiert und z. T. mit einem 0,5 ns langen Moleküldynamiklauf simuliert. Die in den zur Zeit verfügbaren Programmen enthaltenen Energiefunktionen und Kraftfelder arbeiten immer noch mit etlichen Annäherungen an reale Bedingungen, um innerhalb der Rechenkraft heutiger Computer zu bleiben. Deshalb werden bei langen Rechnungen zwar anfangs grobe Fehler (wie zu kurze Atombindungen) ausgeglichen, es sammeln sich dann aber im Laufe der Zeit kleine Fehler an.

Schritt 7: Validierung des Modells

In jedem Homologiemodell treten Fehler auf. Sie hängen von den folgenden Größen ab:

1. Der Sequenzidentität in % zwischen Zielprotein und Strukturvorlage. Ist sie >90% ist das Modell bis auf wenige Aminosäuren so gut wie eine kristallografisch entstandene Struktur. Bei 50-90% Sequenzidentität kann der RMS (*root mean square*) Fehler bis zu 1,5 Å betragen mit noch größeren lokalen Fehlern. Liegt die Sequenzidentität bei 25%, ist ein korrektes Alignment die wichtigste Größe für das Homologiemodell, und es kann oft zu großen Fehlern kommen.
2. Der Anzahl der Fehler in der Strukturvorlage.

Man kann das Modell analysieren auf Normalität hinsichtlich Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkel. Die geometrische Korrektheit der Torsionswinkel Φ und Ψ sowie weiterer Parameter wurde mit dem Programm PROCHECK überprüft (Laskowski et al., 1993). Die Verteilung von polaren und apolaren Aminosäuren zwischen dem Inneren und der Oberfläche kann komplett falsch gefaltete Modelle anzeigen (Baumann et al., 1989). Schließlich können, soweit vorhanden, experimentelle Daten einbezogen werden. Es kann überprüft werden ob die Modelle die experimentellen Daten plausibel erklären. In unserem Fall wurden deshalb die Dimermodelle entwickelt.

An fast jedem Schritt muss man zwischen verschiedenen Möglichkeiten wählen, wobei nie sicher ist, ob man die beste Variante getroffen hat. Es existieren schon Programme, in denen alle diese Schritte automatisiert sind, aber besonders für Fälle, wo die Sequenzidentität von Zielprotein und Strukturvorlage im Grenzbereich der Kurve aus Abb. 1.10 liegt, sind die mit humaner Expertise erstellten Modelle immer noch besser (Fischer et al., 1999).

2.5. Untersuchung von Occludin mit biophysikalischen Methoden

Für diese Untersuchungen wurde das Occludin₄₀₆₋₅₂₁ genutzt, wovon das MBP durch Xa-Verdau abgespalten worden war (siehe 2.1.3). Diese Untersuchungen wurden zusammen mit der Diplomandin Birgit Lassowski durchgeführt. Für die Expertise an den verschiedenen Spezialgeräten wurde mit unterschiedlichen Arbeitsgruppen aus dem FMP und MDC kooperiert.

2.5.1. Analytische Größenausschlusschromatographie von Occludin

Es wurde dazu eine mit PBS-Puffer equilibrierte *Superdex* 200 HR 10/30 Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) verwendet. Deren optimaler Trennbereich für globuläre Proteine liegt zwischen 10-600 kDa. Das verwendete Occludin wurde hier bei der Affinitätsreinigung mit PBS auf der Amylose-Resin-Säule gewaschen und mit PBS mit 5 mM Maltose eluiert. Auch die Dialyse nach der Xa-Abspaltung des MBP erfolgte mit PBS. Es wurden ca. 100 µl einer 0,5 mg/ml konzentrierten Occludinprobe bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die *Superdex*-Säule aufgetragen. Als Größenstandard wurden in mehreren Durchläufen weitere Proteine [Catalase (232 kDa), Albumin (67 kDa) Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuklease (13,7 kDa)] über die Säule gegeben und deren gemittelttes Laufverhalten in einer Regressionsgeraden zusammengefasst. Damit wurden die Occludinpeaks verglichen.

2.5.2. Massenspektroskopie von Occludin

Die Experimente wurden zusammen mit der Massenspektroskopiegruppe vom FMP (M. Schumann und H. Lerch) nach der MALDI-TOF Methode mit einem *Voyager-De STR/Perspective Biosystems*-Massenspektrometer (Perspective Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) durchgeführt. Das zu untersuchende Protein (normales oder selenomethioninhaltiges Occludin) lag als ca. 1 mg/ml Lösung in 0,3% TFA vor. Als Matrixsubstanz diente eine gesättigte Sinapinsäurelösung in einer 1:1-Mischung aus wässriger 0,3% TFA-Lösung und Acetonitril. Für die Untersuchungen wurden gleiche Volumina der Lösungen von Probe und Matrix gemischt und auf den Probenhalter aufgetragen, wo sie kokristallisierten und dann durch die Laseranregung im Gerät weiter untersucht wurden. Die

beobachteten Peaks (Abb. 3.28) zeigten, dass noch Spuren von MBP enthalten waren, obwohl sie nach Coomassiefärbung von SDS-Gelen nicht mehr sichtbar waren. Massenspektroskopische Untersuchungen an Occludin wurden schon länger in unserer Gruppe durchgeführt (Andreeva et al., 2001).

2.5.3. Kristallisation von Occludin

Die Kristallisation des MBP-freien Occludin₄₀₆₋₅₂₁ erfolgte in Kooperation mit M. Kolbe/MDC. Die Proteinproben (siehe 2.1.3) wurden auf ca. 10 mg/ml konzentriert und nach der Diffusionsdampfmethodik kristallisiert. Dazu wurde in 24-Well-Platten 0,8 ml Reservoirlösung vorgelegt und die einzelnen Wells mit silanisierten Deckgläschen luftdicht verschlossen, auf welche die Proteinlösung (in SP5-Puffer), mit einer kleinen Menge Reservoirlösung (in den Verhältnissen 2:1; 1:1; 1:2) als drei 0,5-2 µl Tropfen vermischt, appliziert worden war („*hanging drop*“-Methode). Da jedes Protein andere Kristallisationseigenschaften hat, musste zunächst ein breites Spektrum an verschiedenen Reservoirlösungen mit unterschiedlichen Puffern, Salzen, Fällungsmitteln, sowie an Temperaturen und Zeiten getestet werden. Mit einer Mischung von 20-30% 2,4-Methylpentandiol und 17-27,5% Ethanol bei 18 °C war die Kristallisation von Occludin₄₀₆₋₅₂₁ erfolgreich. Nach etwa drei Tage waren Kristalle sichtbar, die dann weiter untersucht wurden.

2.5.4. Circular dichroismus-Spektroskopie

Diese Untersuchungen erfolgten zusammen mit K. Gast/MDC an einem Spektropolarimeter vom Typ J-720 (Jasco, Japan) in einem Wellenlängenbereich von 193-260 nm bei einer Schrittweite und Bandbreite von je 1nm, einer Integrationszeit von 4 s und bei 20 °C. Es wurde das MBP-freie Occludin₄₀₆₋₅₂₁ (11 µM in SP5) und ein aus ZO-1 stammendes die H2-Helix umfassendes Peptid ZO-1₇₄₅₋₇₇₂ (11 µM in SP5) jeweils einzeln und als 1:1 Gemisch vermessen. Es wurde als Messgröße die schichtdickenunabhängige spezifische Elliptizität $[\theta]$ (Lottspeich und Zorbas, 1998) in $[\text{mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$ erhalten.

$$[\theta] = \theta / 10 \cdot c \cdot d$$

Dabei ist θ die gemessene Elliptizität [mdeg], c die Proteinkonzentration [mol/l] und d die Schichtdicke der Küvette [cm]. Um den prozentualen Anteil von Helices (f_H) in den Proteinen einzuschätzen, wurde die Formel

$$f_H[\%] = -100 \cdot ([\theta]_{222} + 2340) / 30300$$

benutzt (Chen et al., 1972).

2.5.5. Dynamische und statische Lichtstreuung zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Occludin

Die Messungen wurden zusammen mit K. Gast/MDC in SP5-Puffer in einer schwarzen gefensterten Suprasil Quarzküvette mit 0,1 cm Schichtdicke bei 25 °C durchgeführt. Um Staub und Aggregate zu entfernen, wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 60.000 x g, 4 °C) und filtriert (Porengröße 0,1 µM). Trotzdem waren danach immer noch große Aggregate in einigen Proben enthalten, die dort die Messung verhinderten. Es wurden MBP-Occludin₄₀₆₋₅₂₁, das MBP-freie Occludin₄₀₆₋₅₂₁, reines MBP und das H2-Peptid ZO-1₇₄₅₋₇₇₂ untersucht.

Bei der DLS wurden die Proben mit einem Argonlaser bestrahlt und das gestreute Licht sowie die sich aus der brownischen Molekularbewegung ergebenden Fluktuationen des Interferenzmusters analysiert. So kann der Diffusionskoeffizient D [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] von Proteinen modellunabhängig bestimmt werden.

$$D = k_B \cdot T / f$$

Wobei k_B die Boltzmannkonstante [J/K], T die Temperatur [K] und f den Reibungskoeffizienten bedeuten. Daraus lässt sich mit der Viskosität des Lösungsmittels η [$\text{kg/m} \cdot \text{s}$] der Stokes-Radius R_S [nm] berechnen.

$$R_S = k_B \cdot T / 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D$$

Ein Vergleich der Stokes-Radien mit den geometrischen Radien einer gleichschweren Kugel zeigt, wie stark die Form der untersuchten Proteine von einer Kugelform abweicht (Holtzhauer, 1996).

Die SLS nutzt die Proportionalität von Intensität der Lichtstreuung zur Masse und Konzentration [c in mg/ml] der gelösten Moleküle zur Berechnung des Molekulargewichts M [Da] der Proteine aus.

$$I_S = (I_L - I_P) / I_0 = k_{\text{opt}} \cdot c \cdot M$$

Dabei ist I_0 die Intensität des eingestrahlt Lichts, I_L und I_P die Streuintensitäten der Lösung bzw. des Puffers und k_{opt} eine optische Konstante, die den Proportionalitätsfaktor beschreibt.

2.5.6. Analytische Ultrazentrifugation von Occludin

Hierbei wurde mit D. Labudde/FMP kooperiert. Die Experimente zur Sedimentationsgeschwindigkeit (4 °C mit vorgekühltem Rotor, 40.000 x g) erfolgten in Doppelsektorzellen mit 12 mm Schichtdicke mit einer analytischen Ultrazentrifuge vom Typ Optima XL-1 von Beckman (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland). Vor der Messung wurden die Proben zum Entfernen von Verunreinigungen zentrifugiert (4 °C, 3200 x g, 10 min) und nur die Überstände genutzt. In die Küvetten kamen je 270 µl mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (1,5; 1,25; 1; 0,75 und 0,5 mg/ml). Die Detektion erfolgte bei einer

Wellenlänge von 280 nm. Aus diesen Experimenten sollte der Svedbergkoeffizient s [10^{-13} sec] ermittelt werden.

$$s = M \cdot (1 - \underline{v} \cdot \rho) / N \cdot f$$

In der Formel sind die molare Masse M , das partielle spezifische Volumen \underline{v} , die Dichte ρ , die Anzahl der Moleküle N und der Reibungskoeffizient f enthalten. Anschließend wurde versucht in Sedimentationsgleichgewichtsläufen mit den gleichen Konzentrationen bei 120.000 x g über 2 Tage das Assoziationsverhalten von Occludin₄₀₆₋₅₂₁ genauer zu analysieren.

2.5.7. Elektronenmikroskopie von Occludin

Die folgenden Untersuchungen wurden zusammen mit Frau D. Lorenz und Frau Ringling/FMP an einem Transelektronenmikroskop (TEM 902, Carl Zeiss Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Proben (5 μ l; 1,mg/ml) wurden auf ein kleines graphitbeschichtetes Kupfernetz (*grids*) gegeben und nach 1 min der Überstand mit Filterpapier abgesaugt. Als Kontrastmittel diente eine 1-2% wässrige Lösung von Uranylacetat (pH 3-4) (nach Pfefferkorn, 1968; Lottspeich und Zorbas, 1998).

2.5.8. Quervernetzung von Occludin

Um mögliche Oligomierzustände zu charakterisieren wurden Quervernetzungsstudien mit zwei unterschiedlichen Reagenzien [Paraformaldehyd (PA) und Disuccimidylsuberat (DSS)] durchgeführt. Da beide mit der ϵ -Aminogruppe von Lysinen reagieren wurden die Proben in PBS und nicht in Tris-Puffer analysiert. DSS wurde in Endkonzentrationen von 10 μ M bis 2 mM für 20 min zu den Probenlösungen gegeben. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gestoppt. Analog erfolgten die Experimente mit PA, wo Endkonzentrationen von 0,01-2% eingesetzt wurden. Aliquots der jeweiligen Experimente wurden dann bei -20 °C gelagert und später auf SDS-Gele analysiert.

2.5.9. Temperaturstabilität von Occludin₄₀₆₋₅₂₁

Zur Abschätzung der Temperaturstabilität wurden Proben von MBP-freiem Occludin₄₀₆₋₅₂₁ bei 4 °C bzw. Raumtemperatur gelagert und in bestimmten Abständen Proben entnommen und bei -20 °C aufbewahrt. Danach wurden die Proben auf SDS-Gele aufgetragen und bewertet.

2.6. Statistische Auswertung

Alle Messergebnisse wurden mit den Programmen ORIGIN 6 und Excel (Microsoft) statistisch ausgewertet. Die signifikanten Parameter wurden mit dem ANOVA-Test ermittelt und die Messwerte, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) ausgedrückt.