

### 3. Ergebnisse

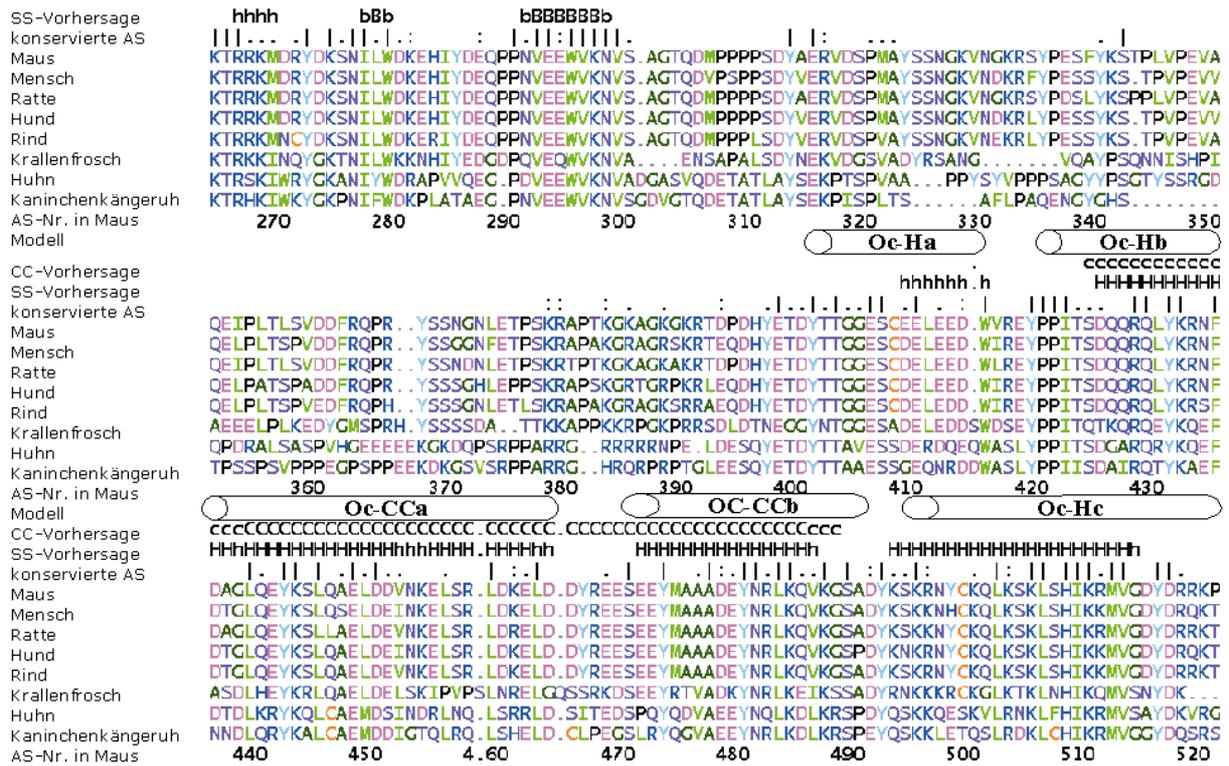
#### 3.1. Bioinformatische Analyse der Proteine

Am Anfang unserer Arbeit stand das Ziel die molekularen Wechselwirkungsmechanismen zwischen Occludin und ZO-1 aufzuklären. Dazu wurden die Teilbereiche der beiden Proteine, die bekanntermaßen aneinander binden (die letzten 150 AS von Occludin, GUK-Domäne von ZO-1; Fanning et al., 1998) mit verschiedenen bioinformatischen Methoden analysiert. Zusätzlich wurden auch die potentiellen Interaktionen von  $\alpha$ -Catenin- und ZO-1-Sequenzen untersucht. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die im Weiteren genannten Aminosäurepositionen aller Proteine auf die jeweiligen Maus-Sequenzen.

##### 3.1.1. Bioinformatische Analyse von Occludin

Bei der Sekundärstrukturvorhersage für den gesamten zytosolischen C-terminalen Teil von Occludin (264-521) zeigte sich ein interessantes Muster. Die N-terminale Hälfte (Occludin<sub>264-405</sub>) enthielt laut verschiedener Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme nahezu keine Sekundärstrukturelemente, während im C-terminalen Teil (Occludin<sub>406-521</sub>) mehrere Helices vorhergesagt wurden. Die mit Occludinsequenzen aus anderen Spezies erhaltenen Vorhersagen deckten sich mit denen der Maus-Sequenz. Auf eine Strukturierung dieses Bereiches weisen auch stärker konservierte Sequenzen zwischen verschiedenen Arten hin. Dazu wurden der prozentuale Anteil gleicher AS (Sequenzidentität) und ähnlicher AS entsprechend von Vergleichsmatrices (Sequenzähnlichkeit; Programm GAP, Matrix *blossum62*) in einer Gegenüberstellung verwandter Sequenzen verglichen. Repräsentativ sind die Werte für die Occludinsequenz von Maus mit der vom Menschen bzw. dem entfernter verwandten Huhn verglichen worden. Es ergeben sich für Occludin<sub>264-405</sub> Sequenzidentitäten (und in Klammern Sequenzähnlichkeiten) von 87,2% (90,1%) bzw. 35,8% (42,5%) und für Occludin<sub>406-521</sub> Werte von 90,5% (96,5%) bzw. 49,1% (59,5%). Das zeigt, dass Occludin zwischen Säugern sehr hoch konserviert ist aber auch mit entfernter verwandten Arten immer noch eine deutliche Sequenzähnlichkeit besteht (Abb.3.1).

Einige der prognostizierten Helices zeigen potentielle Coiled coil (CC)-Eigenschaften mit errechneten Wahrscheinlichkeiten von bis zu 100% (Abb. 3.1, 3.2). Dabei wurden verschiedene CC-Vorhersageprogramme mit unterschiedlichen Algorithmen genutzt, die zu ähnlichen Ergebnissen kamen (Tabelle 3.1). Die zweite Hälfte des C-terminalen Bereichs von Occludin (Maus-Occludin<sub>406-521</sub>) erwies sich in den weiteren Untersuchungen als immer wichtiger und wurde im Weiteren Occludin Coiled coil-Domäne genannt.



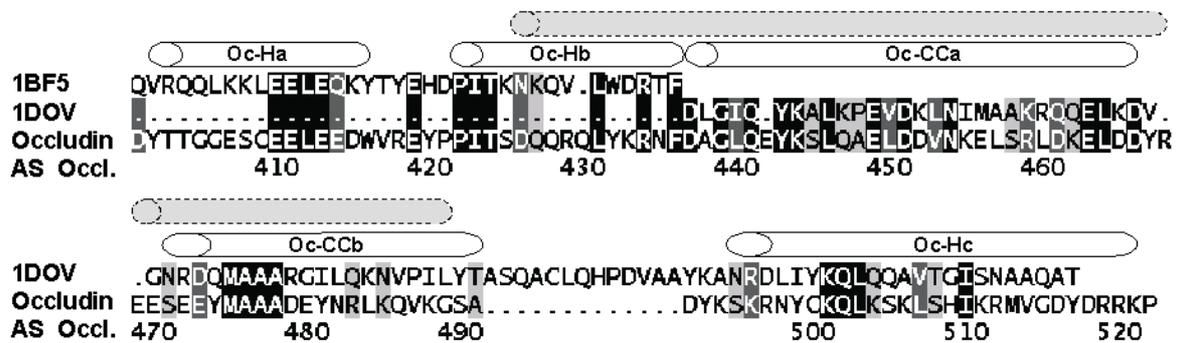
**Abb. 3.1.** Alignment des gesamten C-terminalen zytosolischen Bereichs von Occludin von acht verschiedenen Arten, wobei die Vorhersagen und Aminosäuresequenznummern sich auf die Mausequenz beziehen. Die AS sind nach ihren physikalischen Eigenschaften eingefärbt (basische AS (H, K, R) dunkelblau; saure AS (D, E) rot; hydrophobe AS (F, I, L, M, V, W) grün, wobei kleine hydrophobe AS (A, G) in dunklerem grün gehalten sind; polare AS (N, Q, S, T) violett; AS mit besonderen Eigenschaften sind P (schwarz); Y (hellblau) und C (orange). Angegeben sind die Sekundärstruktur (SS)-Vorhersage (erstellt mit dem Programm: JPRED; mit h, H für  $\alpha$ -Helix; b, B für  $\beta$ -Stränge, wobei Großbuchstaben für starke und Kleinbuchstaben für schwächere Wahrscheinlichkeit der Vorhersage stehen) und CC-Vorhersage (Programm: COILSCAN; "C" ist Vorhersage mit einem Suchfenster von 14 AS, wobei sich der vorhergesagte Bereich erweitert, wenn das Suchfenster auf 28 AS vergrößert wird: um Bereich "c"). Zusätzlich angegeben sind die für das Occludinmonomerenmodell wichtigen Bereiche Oc-Ha, -Hb, -CCa, -CCb und -Hc, wie in Abb.3.3. näher erläutert. Die unterschiedlichen Grade an Konservierung der AS zwischen den verschiedenen Spezies wurden mit "|" für völlige Übereinstimmung und ":" bzw. "." für größere bzw. kleinere Sequenzähnlichkeit gekennzeichnet.

Für die Erzeugung von Homologiemodellen ist es notwendig, eine bekannte dreidimensionale Struktur aus der Proteinstrukturdatenbank (PDB) als Vorlage zu finden. Die Sequenz dieser Strukturvorlage muss mit der Sequenz des Zielproteins hinreichend übereinstimmen, um von einer gleichen oder zumindest sehr ähnlichen Proteinfaltung ausgehen zu können. Dies ist erfahrungsgemäß bei  $\geq 30\%$  Sequenzidentität gegeben. Bei Occludin wurde für das Modell der Bereich 400-521 betrachtet, da es nur hier eine gute Sekundärstrukturvorhersage gab. Für diesen Bereich von Occludin wurden zwei Proteinstrukturen gefunden (PDB-Nr.: 1BF5, 1DOV), die hohe Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Abb. 3.2). Weitere Details werden im Abschnitt 3.2.1. ausgeführt.

**Tabelle 3.1.** Vergleich der durch verschiedene Programme (MATCH, COILSCAN und COILS) erhaltenen CC-Helix-Vorhersagen in Maus-Occludin.

Mit w ist jeweils das bei COILSCAN und COILS verwendet Suchfenster angezeigt, mit dem die besten Resultate erzielt wurden. Dabei entsprechen 14, 21 oder 28 AS jeweils 2, 3 oder 4 14 bzw. 28 AS jeweils 2 oder 4 Wiederholungen des CC-Heptadmusters. Die Vorhersage im Programm COILS ist weiter unterteilt in eine normale Vorhersage und eine, wo die CC-Positionen a und d 2,5-fach gegenüber den restlichen Positionen in Heptadmuster stärker gewichtet sind. (\* keine signifikante Vorhersage; \*\*Scoring-Matrix abgeleitet von Myosin, Tropomyosin, Intermediärfilamenten, desmosomalen Proteinen und Kinesin, Lupas, et al., 1991).

Proteinelement	vorhergesagte CC-Region		CC-Wahrscheinlichkeit (%)		
	MATCH	COILSCAN, COILS	COILSCAN	COILS (MTIDK)** normal	COILS (MTIDK)** gewichtet
Oc-Ha	keine	405-418 (w14)	0*	0*	0*
z.T.Oc-Hb, Oc-CCa,-Oc-CCb	426-498	424-488 (w28)	100	100	100
Oc-Hc	499-520	499-513 (w14)	14*	19*	27*



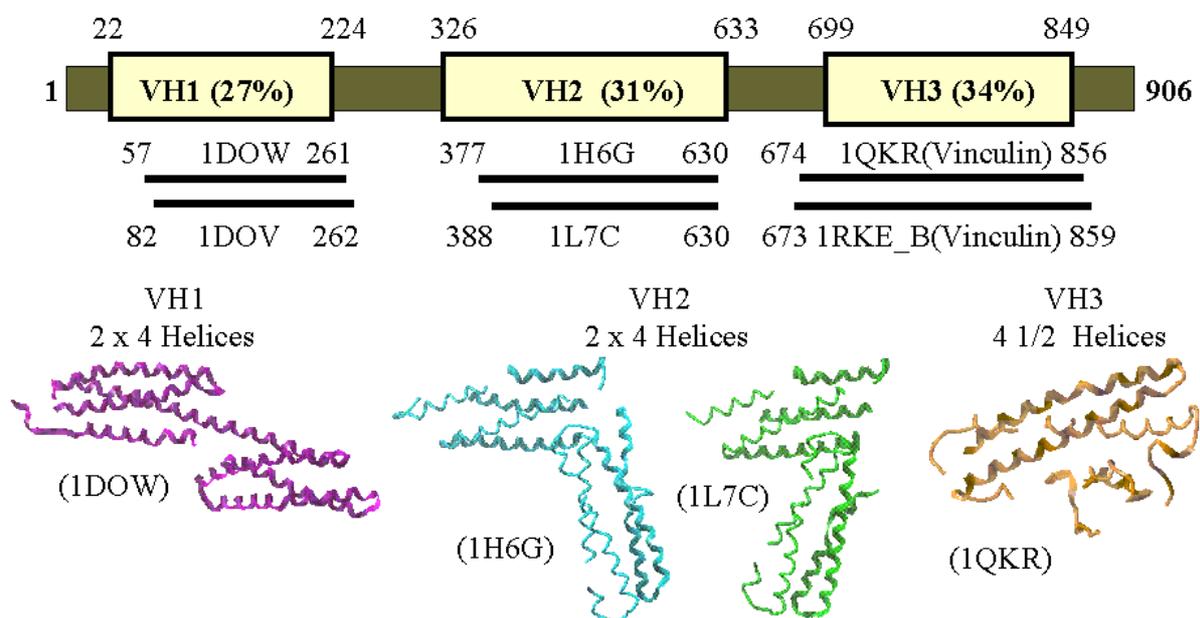
**Abb. 3.2.** Alignment von Maus-Occludin<sub>400-521</sub> mit den gefundenen Strukturvorlagen aus der PDB. 1BF5 stammt aus dem humanen STAT-1-Protein, 1DOV aus murinem  $\alpha$ -Catenin. Ähnlichkeiten sind verschieden unterlegt: für identische Aminosäuren (schwarz), für Aminosäuren mit hoher Ähnlichkeit (dunkelgrau) und für geringe Ähnlichkeit (hellgrau). Als weiße Zylinder sind die Bereiche dargestellt, die in den Vorlagen aus  $\alpha$ -Helices bestehen. Graue Zylinder markieren vorhergesagte CC-Bereiche. Zur besseren Beschreibung wurden den einzelnen Helices aus den Strukturvorlagen individuelle Namen gegeben. Der Prefix Oc steht für Occludin, während die Suffixe CCa, CCb Helices mit durchgehend vorhergesagten CC-Eigenschaften und die Suffixe Ha, Hb, Hc einfache  $\alpha$ -Helices kennzeichnen.

Das als sequenzhomolog gefundene Fragment aus 1BF5 (vom humanen STAT-1-Protein) umfasste zwei antiparallel liegende Helices, die durch einen Turnbereich verbunden sind. Außerordentlich interessant war der Befund, dass das größere gefundene Fragment 1DOV aus einem AJ-Protein stammte. Es handelte sich um das Protein  $\alpha$ -Catenin. Der homologe Bereich liegt innerhalb eines Vierhelixbündels, wobei nur die C-terminal gelegenen drei Helices eine Sequenzähnlichkeit zeigen.  $\alpha$ -Catenin kommt an AJ vor und bindet dort wie Occludin in den TJ an ZO-1. Da AJ und TJ funktionell und ontogenetisch zusammenhängen, könnte diese Sequenzähnlichkeit auf einen möglicherweise gleichartigen Bindungsmechanismus oder sogar einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hindeuten

(Abb. 1.4). Diese unerwarteten bioinformatischen Ergebnisse führten zur Aufnahme von  $\alpha$ -Catenin in unsere Studien.

### 3.1.2. Bioinformatische Analyse von $\alpha$ -Catenin

$\alpha$ -Catenin ist mit 906 AS ein relativ großes Protein und enthält drei Regionen, die zu dem Protein Vinculin homolog sind. Große Teile von  $\alpha$ -Catenin wurden schon kristallisiert und es zeigte sich, dass es überwiegend aus Vierhelixbündeln besteht. Für den C-Terminus sind homologe Kristallstrukturen aus Vinculin bekannt (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3.** Analyse von Maus- $\alpha$ -Catenin mit den vinculinhomologen Regionen VH1-3 (Sequenzidentität in % zwischen  $\alpha$ -Catenin und Vinculin nach Herrenknecht et al., 1991, und Grenzen der VH-Regionen nach Yang et al., 2001). Darunter ist gezeigt, welche Teile des Proteins schon als Kristallstrukturen bekannt sind (vierstellige Codes sind die jeweiligen PDB-Nummern), wobei für ausgewählte Kristallstrukturen das Proteinrückrad als Bänderdarstellung gezeigt ist. Für die VH3 Region sind nur Strukturen aus Vinculin bekannt, die hier mit den homologen Sequenznummern aus  $\alpha$ -Catenin beschriftet sind. Beim Betrachten der Strukturen zeigte sich, dass sie zum größten Teil aus Vierhelixbündeln bestehen. Diese Helixbündel können sich wahrscheinlich gegeneinander bewegen, wie der unterschiedliche Winkel zwischen den Bündeln bei den zwei Strukturen der VH2-Region zeigt. Bei der VH3 Region ist noch eine fünfte Helix beteiligt, die aber nur etwa halb so lang ist, wie die anderen vier.

Die Vorhersageprogramme lieferte für die VH1 Region von  $\alpha$ -Catenin keine signifikanten CC-Ergebnisse, also zeigen die Helices dort nicht die typischen CC-Merkmale. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist hingegen eine CC-Interaktion am VH2-Helixbündel beteiligt. Des Weiteren werden zwei CC-Bereiche vorhergesagt, die C- bzw. N-terminal der VH3-Region liegen. Welche Struktur diese Regionen haben, ist unklar, da die bekannten Strukturen von

Vinculin zwar zum Teil in diese Bereiche hineinragen aber dort nicht mehr sequenzhomolog zu  $\alpha$ -Catenin sind (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2.** Vergleich der durch verschiedene Programme (MATCH, COILSCAN und COILS) erhaltenen CC-Helix-Vorhersagen in Maus- $\alpha$ -Catenin. Zur Erläuterung der Spaltenüberschriften und Abkürzungen siehe Tabelle 3.1.

Proteinelement	vorhergesagte CC-Region		CC-Wahrscheinlichkeit (%)		
	MATCH	COILSCAN, COILS	COILSCAN	COILS (MTIDK)** normal	gewichtet
$\alpha$ -Catenin VH2	328-385	327-351 (w21)	51	55	28*
		357-385 (w28)	100	99	97
$\alpha$ -Catenin vor und in VH3	667-702	678-707 (w28)	99	99	69
$\alpha$ -Catenin nach VH3	873-889	876-889 (w14)	52	61	18*

Klammert man die beste Sequenzähnlichkeit zwischen Occludin und  $\alpha$ -Catenin<sub>172-262</sub> (Tabelle 3.4) aus, gibt es noch eine weitere etwas schwächere Ähnlichkeit zwischen der CC-Domäne von Occludin und  $\alpha$ -Catenin<sub>631-766</sub>. Nach den enthaltenen Sequenzähnlichkeiten scheint das komplette  $\alpha$ -Catenin-Gen durch mehrfache Verdopplung einer Vierhelixbündelstruktur entstanden zu sein, was auch diese zweite Ähnlichkeit erklären würde. In diesem zweiten  $\alpha$ -Cateninbereich in VH3 gibt es im Gegensatz zum occludinhomologen Bereich in VH1 sogar eine CC-Vorhersage ( $\alpha$ -Catenin<sub>678-707</sub>, Tabelle 3.2). Der Bereich  $\alpha$ -Catenin<sub>631-906</sub> ist laut Literaturangaben (Imamura, et al., 1999) auch für die ZO-1-Bindung verantwortlich, während  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub> keine Bindung an ZO-1 zeigte. Für die ZO-1-Bindung von  $\alpha$ -Catenin ist also nicht nur ein zu Occludin homologer Bereich, sondern wahrscheinlich auch ein CC-Motiv notwendig.

### 3.1.3. Bioinformatische Analyse von ZO-1

Die Sekundärstrukturvorhersage der GUK-Domäne von ZO-1 enthält  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge. Die CC-Vorhersage ergibt zwei kurze CC-Helices, wobei die CC-Wahrscheinlichkeit von ZO-1-CC1 nur wenig oberhalb der Signifikanzgrenze von 50% liegt (Tabelle 3.3). ZO-1-CC1 liegt N-terminal vor dem bisher beschriebenen Interaktionsbereich mit Occludin (Fanning et al., 1998). Die erhaltene CC-Wahrscheinlichkeit (60%) war unverändert, wenn die Wichtungsfunktion von COILS zu den hydrophoben Heptad-Positionen 'a' und 'd' benutzt wurde. Das bestätigt die CC-Neigung in ZO-1-CC1. Für CC1 und CC2 wurden die CC-Muster mit signifikanter Wahrscheinlichkeit nur mit dem kleinsten Suchfenster (Größe 14) der Programme COILS und COILSCAN gefunden. D.h. es existieren nur kurze CC-Interaktionsregionen in ZO-1, die dann wahrscheinlich auch keine sehr feste Bindung bewirken. Dies spricht dafür, dass die durch diese CC-Helix vermittelte Bindung keine

langanhaltende feste strukturelle Interaktion bewirkt, da dafür zu wenig interagierende AS vorhanden sind. Es deutet eher auf eine regulatorische Wirkung hin, wo sich die Bindungen unter dem Einfluss anderer Faktoren relativ schnell bilden und wieder lösen. Dazu passt auch die in der ZO-1-CC1-Region beschriebene Phosphorylierungsstelle (Balda et al., 1996a). Für eine bestimmte Helix (H2) bestand nach Betrachtung der Sequenz wegen dreier Leucine jeweils in einem Abstand von sieben AS eine CC-Vermutung, die aber durch die Vorhersageprogramme nicht bestätigt wurde. Der  $\alpha$ -helikale Charakter von H2 zeigte sich aber in Sekundärstrukturvorhersagen und auch in homologen Strukturen.

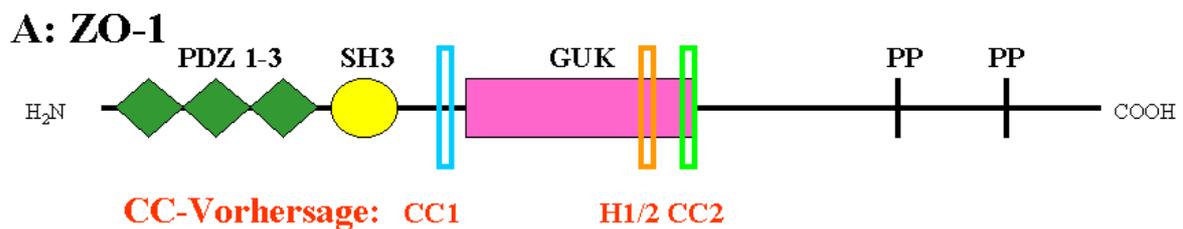
**Tabelle 3.3.** Vergleich der durch verschiedene Programme (MATCH, COILSCAN und COILS) erhaltenen CC-Helix-Vorhersagen in Maus- $\alpha$ -ZO-1. Zur Erläuterung der Spaltenüberschriften und Abkürzungen siehe Tabelle 3.1.

Proteinelement	vorhergesagte CC-Region		CC-Wahrscheinlichkeit (%)		
	MATCH	COILSCAN, COILS	COILSCAN	COILS (MTIDK)** normal	gewichtet
ZO-1-CC1	607-624	611-624 (w14)	50	60	61
ZO-1-H2	keine	750-769 (w14)	5*	6*	5*
ZO-1-CC2	785-797	784-798 (w14)	92	94	91

Während des Bearbeitungszeitraums wurden durch die Deponierung von neuen GUK-Kristallstrukturen in der PDB mehrmals neue homologe Strukturvorlagen für die ZO-1-GUK-Modelle veröffentlicht (Abb. 3.4).

Anfangs war nur eine Struktur des gesamten Enzyms Guanylatkinase von Hefe mit dem gebundenen Kofaktor GMP vorhanden (PDB-Nr. 1GKY). Laut dieser Struktur besteht das Protein aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, an die außen jeweils  $\alpha$ -Helices angelagert waren. Die Gesamtform ähnelte den beiden Schalen einer Muschel (genannt "Coreregion" für den größeren Bereich und einer GMP-Bindungsregion für den kleineren), zwischen denen das GMP eingeklemmt war. Innerhalb der GMP-Bindungsregion liegen wichtige Aminosäuren, die für die GMP-Bindung essentiell sind, insbesondere zwei Arginine (Abb. 3.7). Bei ZO-1, wie auch bei den anderen ZO-Proteinen, ist die GMP-Bindungsregion jedoch erheblich kürzer (~30 statt 60 AS), ohne eine Sequenzähnlichkeit zu den enzymatisch aktiven GUK-Strukturen aufzuweisen, wobei auch alle für die GMP-Bindung wichtigen Aminosäuren fehlen. Dies deutet darauf hin, dass dieser Bereich in ZO-1 anders gefaltet sein muss. Kurz nach Beginn dieser Arbeit wurden zwei weitere GUK-Strukturen von Hefe veröffentlicht, die je einmal ohne bzw. mit GMP kristallisiert wurden (PDB-Nr. 1EX6, 1EX7). Dort wurde GUK rekombinant hergestellt und nicht aus Hefe isoliert, wodurch es hier keine N-terminale Acetylierung gab. Trotzdem zeigten sich keine signifikanten Abweichungen zwischen den

Strukturen 1GKY und 1EX7. Die Apo-Form von GUK ohne GMP (1EX6) lag in zwei leicht verschiedenen Strukturen vor (RMSD von 1,20 Å aller C $\alpha$ -Atome von A und B Form).



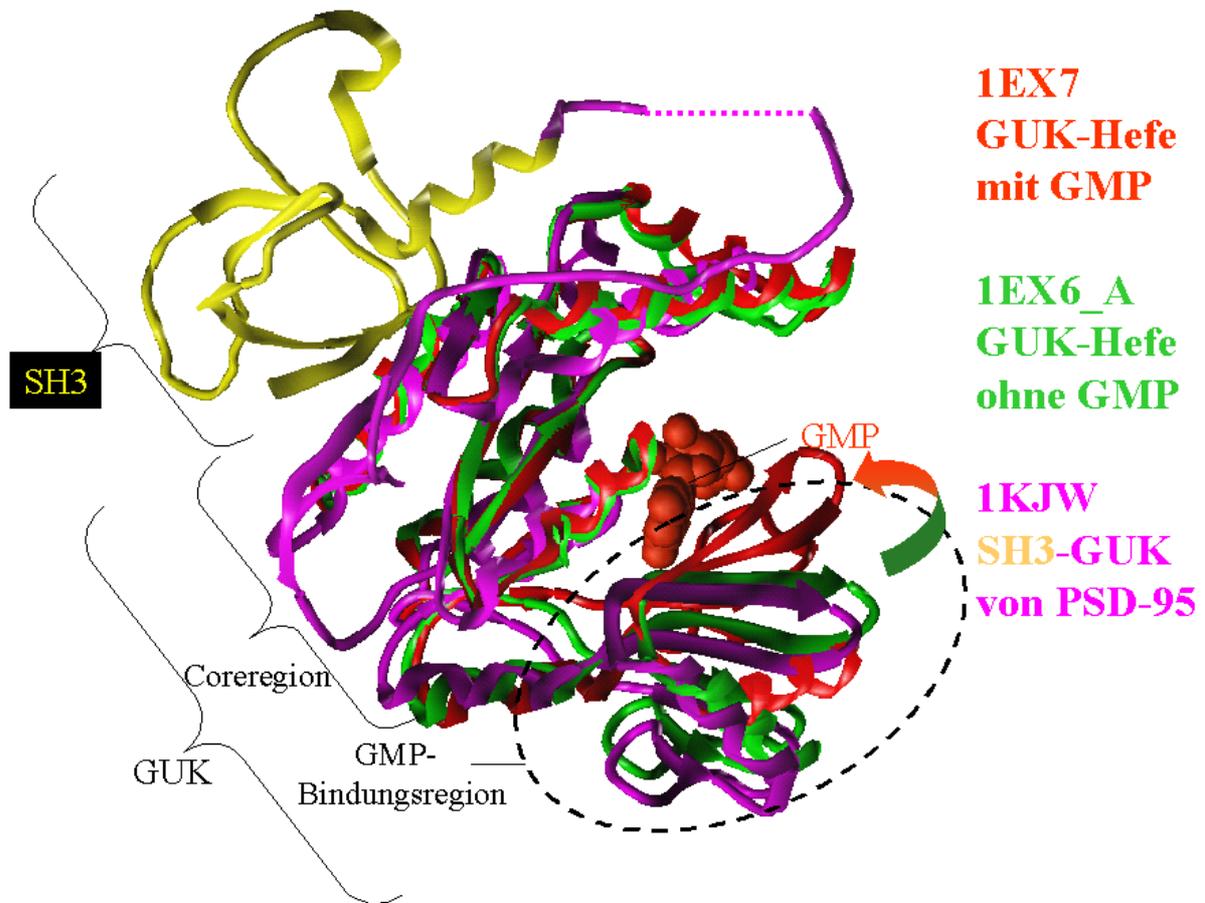
### B: Bekannte GUK-Kristallstrukturen

PDB-Nr.	Herkunft der Struktur	Auflösung	Freigabe
1GKY	<i>GUK</i> (Hefe) mit GMP	2,00 Å	1994
1EX6	<i>GUK</i> (Hefe) ohne GMP	2,30 Å	16.03.01
1EX7	<i>GUK</i> (Hefe) mit GMP	1,90 Å	16.03.01
1KGD	<i>GUK</i> (humanes CASK) ohne GMP	1,31 Å	19.12.01
1KJW	SH3-GUK (Ratten-PSD95) ohne GMP	1,80 Å	09.01.02
1JXO	SH3-GUK (Ratten-PSD95) ohne GMP	2,30 Å	16.01.02
1JXM	SH3-GUK (Ratten-PSD95) mit GMP	2,00 Å	16.01.02
1LVG	<i>GUK</i> von Maus mit GMP und ADP	2,10 Å	11.12.02
1S4Q	<i>GUK</i> von Mycobacterium Tuberculosis ohne GMP	2,16 Å	27.01.04
1S96	<i>GUK</i> (E.coli) ohne GMP (Dimer)	2,00 Å	10.02.04
1T3L	<i>GUK</i> aus einem Calciumkanalprotein (Kanninchen)	2,20 Å	25.05.04

**Abb. 3.4. A)** Domänenstruktur von ZO-1 mit drei PDZ-, einer SH3- und einer GUK-Domäne sowie zwei Polyprolinregionen (PP) im C-terminalen Bereich mit schematisch angegebener Lage einiger vorhergesagter Elemente (von Tabelle 3.3). **B)** In der PDB veröffentlichte GUK-Strukturen, geordnet nach ihrem Freigabedatum. Kursiv dargestellte GUKs sind enzymatisch aktiv, die anderen sind inaktive Proteinbindungsdomänen.

Bemerkenswert war hier, dass die Muschelform im ungebundenen Zustand offen war und sich nach GMP-Bindung schloss. Dabei änderten sich die RMSD-Werte C $\alpha$ -Positionen der Unterstrukturen (*Core*, GMP-Bindungsregion) um weniger als 1Å, aber die gesamte RMSD-Abweichung von Apo-Form A bzw. B zu GUK-GMP beträgt 3,64 Å bzw. 4,37 Å (Blaszcyk et al., 2001). Zur besseren Anschauung wurden verschiedenen GUK-Kristallstrukturen in ihrer Coreregion übereinandergelegt, so dass man die relative Bewegung der GMP-Bindungsregion dazu sieht (Abb.3.5).

Später wurde die Struktur der GUK-Domäne des humanen CASK-Proteins publiziert, welches wie ZO-1 zur Familie der MAGUK Proteinen gehört. Im Bereich einer kleinen Helix (H1; liegt kurz vor der in Tabelle 3.3. genannten  $\alpha$ -Helix H2) gibt es bei hCASK jedoch eine Deletion von etwas 10 AS im Vergleich zu ZO-1 oder auch GUK von Hefe (siehe auch Abb. 3.8, Anhang). Wegen der Verfügbarkeit ähnlicher Strukturvorlagen ohne diese Abweichung wurde auf die CASK-Struktur als Strukturvorlage zur Modellierung verzichtet.

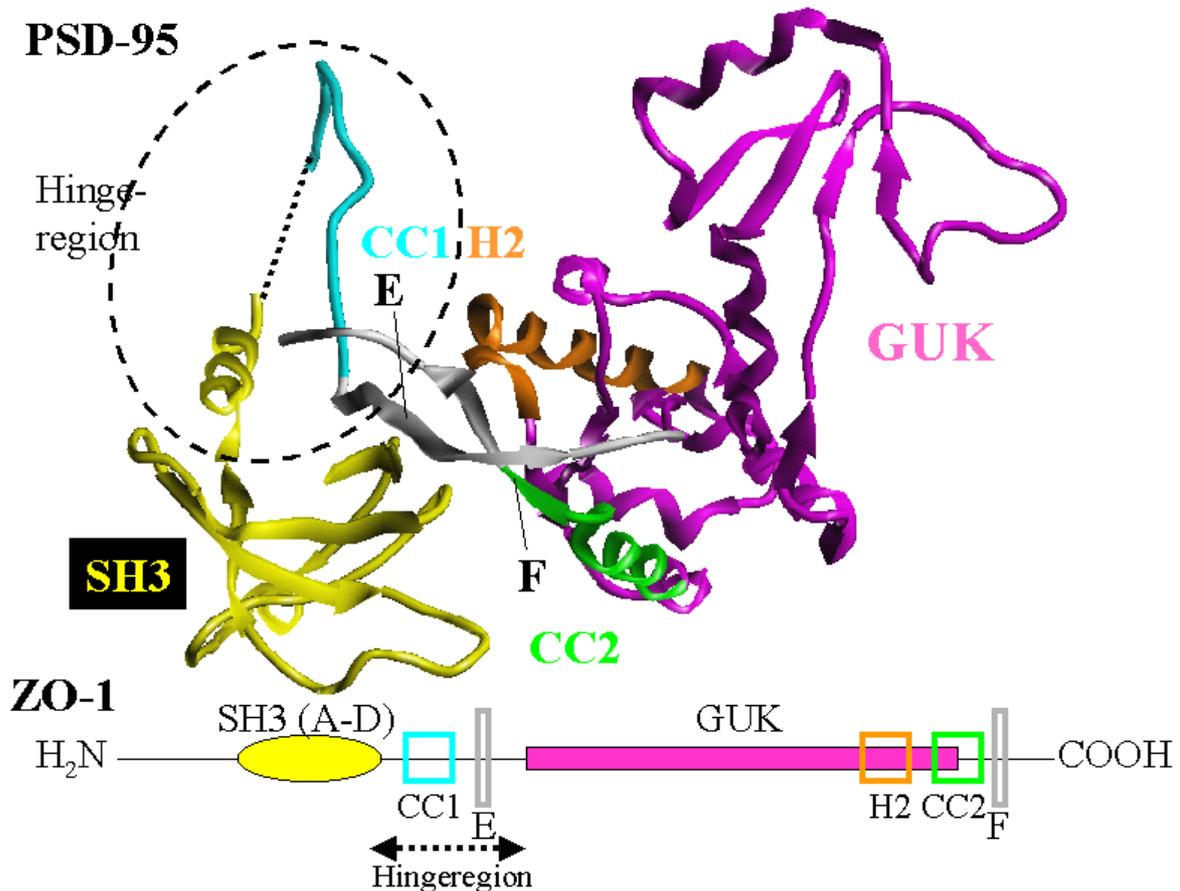


**Abb. 3.5.** Überlagerung von drei homologen GUK-Strukturen in der Coreregion zeigt relative Bewegung (Pfeil) der GMP-Bindungsregion nach GMP-Bindung zwischen der GMP-freien (grün) und GMP-gebundenen Form (rot) von GUK aus Hefe. Die entsprechenden PDB-Nr. sind jeweils in denselben Farben dargestellt wie die dazugehörigen Bänderdarstellungen der Strukturen. Nur die rote 1EX7-Struktur zeigt eine Bewegung der GMP-Bindungsregion in Richtung GMP und Coreregion. Die Apo-Form der Guanylatkinase von Hefe (1EX6 hier Struktur A) und auch homologe GUK-Strukturen aus den MAGUK-Proteinen PSD-95 (1KJW, gelb-SH3, magenta-GUK) und CASK (1KGD, Struktur nicht gezeigt) sind offener. Die SH3-Domäne (gelb) von PSD-95 liegt auf der entgegengesetzten Seite der Coreregion und hat keinen Einfluss auf die GMP-Bindung.

Den größten Einfluss auf unsere Struktur-Funktions-Betrachtungen hatten jedoch die neuen Kristallstrukturen des MAGUK-Proteins PSD-95, in denen SH3- und GUK-Domäne zusammen enthalten waren (PDB-Nr: 1KJW, 1JXM, 1JXO). Beide Domänen sind dort über eine Interaktion von sechs  $\beta$ -Strängen (A-F) zu einer gemeinsamen strukturellen Einheit verbunden. Diese  $\beta$ -Stränge liegen innerhalb der SH3-Domäne (A-D), sowie N-terminal (E) und C-terminal (F) von der GUK-Domäne (McGee et al., 2001; Tavares et al., 2001). Die 1KJW-Struktur (Abb. 3.6) hatte mit drei Aminosäuren in der Hingeregion zwischen SH3 und GUK die wenigsten Fehlstellen von den drei SH3-Hinge-GUK-Strukturen und wurde deshalb für die Generierung der homologen ZO-1-Modelle benutzt.

Vergleicht man ZO-1- und PSD-95-Sequenzen, ergeben sich markante Unterschiede in Länge und Sequenz nur in der Hingeregion, die SH3 und GUK verbindet und in der GMP-

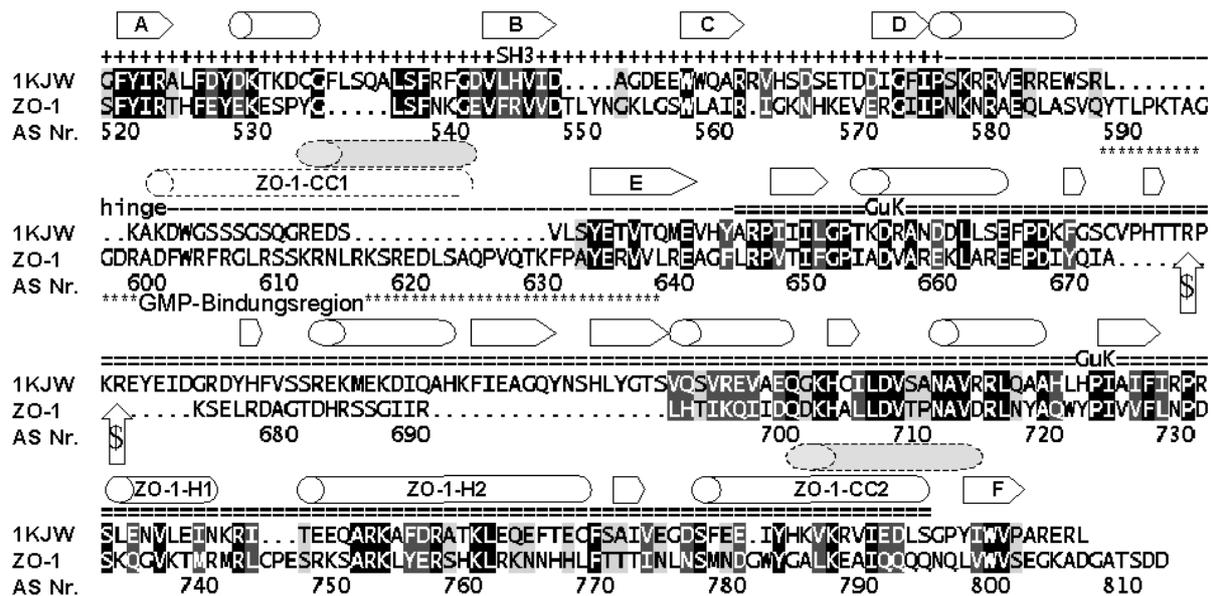
Bindungsregion innerhalb von GUK. ZO-1 hat eine um etwa 20 AS längere Hingeregion, die zusätzlich die vorhergesagte CC1-Helix enthält, während die GMP-Bindungsregion im Vergleich zu PSD-95 um ca. 30 AS kürzer ist (Abb. 3.7).



**Abb. 3.6.** Proteinrückradansicht der SH3-GUK-Struktur von PSD-95 (PDB-Nr.: 1KJW). Die SH3-Domäne (gelb) und die GUK-Domäne (magenta) sowie weitere wichtige Strukturelemente, die auch in ZO-1 konserviert sind, wie H2 (orange) und CC2 (grün) sind farblich hervorgehoben. Die markierten  $\beta$ -Stränge E und F sorgen zusammen mit den  $\beta$ -Strängen A-D der SH3-Domäne für die Interaktion zwischen den beiden Domänen. In der Kristallstruktur sind zwischen SH3- und GUK-Domäne drei Aminosäuren nicht sichtbar (schwarze Strichellinie). Im unteren Teil der Abbildung sieht man eine schematische Darstellung desselben SH3-GUK-Bereiches von ZO-1. Der Bereich zwischen SH3 und GUK-Domäne ist bei ZO-1 etwa um 20 AS länger als bei PSD-95 und enthält die vorhergesagte CC-Helix ZO-1-CC1. Der entsprechende Bereich in der Hingeregion, wo laut Sequenzvergleich (in Abb. 3.7) diese Helix liegen müsste, ist im oberen Bildteil hellblau gekennzeichnet.

Ein Sequenzvergleich von etwa 30 MAGUK-Proteinen (siehe Anhang S. 151-155) zeigt besonders hohe Konservierung im Bereich der  $\beta$ -Stränge E und F. Die über diese  $\beta$ -Stränge gebildete SH3-Hinge-GUK-Einheit scheint deshalb ein allgemeines Merkmal dieser Proteinfamilie zu sein. In der SH3-GUK-Kristallstruktur von PSD-95 existiert zwischen den  $\beta$ -Strängen A und E eine Salzbrücke (R434, E524) sowie zwischen den Strängen A, B, E und F ein Cluster von hydrophoben Aminosäuren (Y432, V459, V526, W717). Diese stabilisierenden Strukturelemente sind auch in nahezu allen anderen MAGUK Proteinen

konserviert (Abb. 3.8. und Anhang S. 151-155). Nach unseren Modellen wird in Maus-ZO-1 die Salzbrücke von R522 und E640 gebildet, während der hydrophobe Cluster aus Y520, V542, V636 und W799 gebildet wird. Ein Vergleich mit einer SH3 mit bekannter Bindung an Polyprolinmotive (1AEY) bestätigt, dass auch ZO-1 und andere MAGUKs die dafür nötigen aromatischen AS enthalten (in ZO-1: Y527, W557 und Y633). Die Zugänglichkeit zu diesen AS ist jedoch in der 1KJW-Struktur und dem ZO-1-Modell durch die große Hingeregion zwischen den  $\beta$ -Strängen D und E, die es in der klassischen SH3 nicht gibt, erschwert.



**Abb. 3.7.** Sequenzvergleich von Maus-ZO-1<sub>518-812</sub> (mit AS-Nummern) mit der gefundenen Strukturvorlage aus der PDB. 1KJW kam vom PSD-95-Protein der Ratte. Ähnlichkeiten sind verschieden unterlegt für identische Aminosäuren (schwarz), für Aminosäuren mit hoher Ähnlichkeit (dunkelgrau) und für geringe Ähnlichkeit (hellgrau). Als weiße Zylinder bzw. Pfeile sind die Bereiche dargestellt, die in der Vorlage aus  $\alpha$ -Helices bzw.  $\beta$ -Strängen bestanden. Graue gestrichelte Zylinder markieren die vorhergesagten CC-Bereiche. Zur besseren Beschreibung wurden den einzelnen  $\alpha$ -Helices (CC1, H1, H2, CC2) und  $\beta$ -Stränge (A, B, C, D, E, F) individuelle Namen gegeben. Die im Modell verwendete Helix CC1 ist als Zylinder mit Strichellinien dargestellt, da wegen der hier vorliegenden starken Sequenzunterschiede dieser Bereich des Modells aus anderen Strukturvorlagen gebildet wurde. Die Pfeile mit „\$“ zeigen die für die GMP-Bindung wichtigen zwei Argininreste, die in PSD-95 noch vorhanden sind, aber in ZO-1 nicht mehr.

### 3.1.4. Zusammenfassung der bioinformatischen Untersuchungen von Occludin, $\alpha$ -Catenin und ZO-1

In allen drei Proteinen wurden CC-Sequenzen vorhergesagt, die als mögliche Interaktionsbereiche für die Occludin/ZO-1- bzw.  $\alpha$ -Catenin/ZO-1-Bindung in Frage kommen. Auch fanden sich in allen Fällen mögliche Strukturvorlagen in der PDB für die spätere Modellierung, wobei es bei  $\alpha$ -Catenin für einige Bereiche sogar schon Kristallstrukturen von dem Protein selbst gab. Diese Vorlagen stimmten relativ gut mit

Sekundärstruktur-Vorhersagen der dazugehörigen Zielsequenzen überein. Bei Occludin ergab sich dabei eine mögliche Unterteilung des CC-Bereichs durch einen Turn in Oc-CCa und – CCb. Am aufregendsten war die unerwartete Entdeckung einer  $\alpha$ -Catenin-Struktur als Vorlage für Occludin, da beide Proteine ZO-1 binden und am TJ/AJ-Komplex vorkommen. Als Strukturvorlage für ZO-1 wurde eine homologe MAGUK-Struktur von PSD-95 gefunden. Diese zeigte überraschenderweise eine strukturelle Einheit zwischen den SH3 und GUK-Domänen, die nach den Sequenzhomologien auch in ZO-1 vorkommt.



**Abb. 3.8.** Sequenzvergleich von ZO-1<sub>518-812</sub> mit der Strukturvorlage 1KJW (PSD-95 von Ratte) und weiteren PDB-Strukturen mit Angabe der jeweiligen Sekundärstruktur (SS) aus den Kristallstrukturen (b, B=  $\beta$ -Strang; h, H=  $\alpha$ -Helix). Bei der Angabe der Sekundärstruktur von 1KJW sind die  $\beta$ -Stränge A-F mit den jeweiligen Buchstaben in Klammer bezeichnet. 1AEY, eine klassische SH3-Domäne aus  $\alpha$ -Spektrin vom Huhn; 1EX7, das aktive GUK-Enzym von Hefe; 1KGD, die GUK-Domäne von humanen CASK-Protein. Bei hCASK sind die Aminosäuren mit den großen Buchstaben in der Kristallstruktur enthalten (Die Aminosäuren HM sind ein Klonierungsartefakt und müssten eigentlich FK lauten, wo „fk“ steht), während Sequenzen mit kleinen Buchstaben eingefügt worden sind, um die Konservierung der  $\beta$ -Stränge E und F zu zeigen. Die Hingeregion und die GMP-Bindungsregion sind durch gelbe bzw. rote Pfeile markiert. Eine Salzbrücke zwischen den  $\beta$ -Strängen A und E ist durch “+“ und “-“ und die Aminosäuren des hydrophoben Clusters zwischen den  $\beta$ -Strängen A, B, E und F durch “#“ gekennzeichnet. “S“ zeigt die für die GMP-Bindung wichtigen Arginine in der Guanylatkinase von Hefe. Die klassischen SH3-Domänen binden polyprolinreiche Sequenzen anderer Proteine mit den durch P gekennzeichneten aromatischen Aminosäuren. Die sind auch konserviert in den MAGUK Proteinen, aber das Tyrosin in Strang E ist durch die große Hingeregion in 1KJW teilweise von der Oberfläche abgeschirmt. Färbung der AS siehe Abb. 3.1.

### 3.2. Monomere Homologiemodelle von Occludin, $\alpha$ -Catenin und ZO-1

Um die oben genannten Vorhersagen weiter zu unterstützen wurden homologe molekulare Modelle auf der Basis von sequenzhomologen strukturellen Vorlagen aus der Proteinstrukturdatenbank (PDB) generiert. Sie sollten dabei helfen, die Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen Occludin,  $\alpha$ -Catenin und ZO-1 zu verstehen und molekulare Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Proteinen aufzudecken.

#### 3.2.1. Monomermodell von Occludin

Die für das Monomermodell von Occludin verwendeten Strukturvorlagen aus der PDB (1BF5 und 1DOV) wurden schon unter Punkt 3.1.1. beschrieben. Ein Sequenzvergleich der gefundenen Sequenzen mit Occludin ist im Abb. 3.2. zu finden. Die Bestimmung der Sequenzidentitäten ergab Werte oberhalb des Grenzwertes von 30%. Es ist daher wahrscheinlich, dass die zu Occludin homologen Fragmente dieser Strukturvorlagen auch die Struktur der entsprechenden Bereiche von Occludin repräsentieren (siehe Tabelle 3.4).

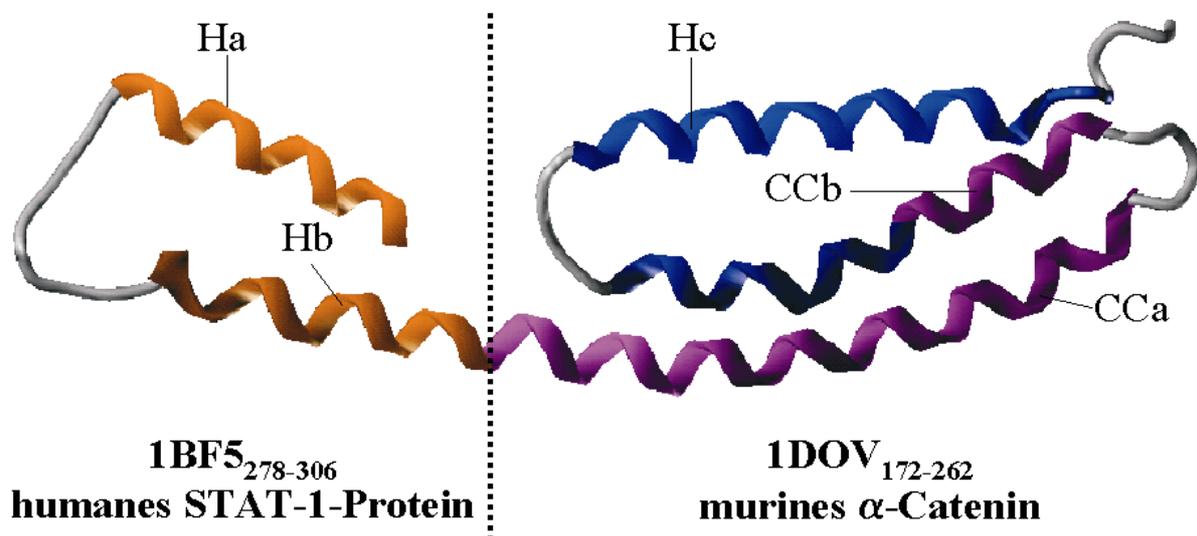
**Tabelle 3.4.** Vergleich der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten zwischen ausgewählten Bereichen von Maus-Occludin mit den in der PDB gefundenen Strukturvorlagen berechnet nach der *blossum62* Matrix mit Programm GAP (aus SEQLAB).

Protein-Strukturelement	Sequenzbereich	Vorlage (Protein, PDB-Nr. und Sequenznummern)	% Identität	% Ähnlichkeit
Oc-Ha, Oc-Hb Region	Occl 406-435	STAT-1(1BF5) 278-306	41,4	55,1
Oc-CCa/b and Oc-Hc	Occl 436-521	$\alpha$ -Catenin (1DOV) 172-262	33,3	37,2
BESTFIT CC-Region	Occl 436-477	$\alpha$ -Catenin (1DOV) 172-210	41,0	48,7
Oc-Hc Region	Occl 491-509	$\alpha$ -Catenin (1DOV) 236-255	36,8	36,8

Die Sekundärstruktur der gefundenen Vorlagenfragmente stimmte gut mit den erhaltenen Vorhersagen für Occludin überein. Innerhalb des zu  $\alpha$ -Catenin homologen Bereiches von Occludin fällt ein Bereich (BESTFIT-Region) durch erhöhte Sequenzähnlichkeit auf. Er entspricht auch weitgehend dem Bereich der CC-Vorhersage. Auch für die Oc-Hc Region gibt es eine leicht überdurchschnittliche Sequenzidentität.

Für das Homologiemodell von Occludin (Monomer) wurde die Strukturvorlage 1DOV<sub>172-262</sub> von Maus- $\alpha$ -Catenin als Grundlage benutzt. Der Sequenzvergleich von Occludin und 1DOV (Abb. 3.2) zeigt, dass in Occludin nach Position 490 13 AS im Vergleich zu 1DOV fehlen. Dieser Bereich bildet in 1DOV ein Helix-Turn-Helix-Motiv und wurde im Modell gelöscht, wodurch die angrenzenden Helices Oc-CCb und Oc-Hc um je etwa zwei Windungen kürzer wurden als die Strukturvorlage. Die im Turnbereich von Oc-CCa und Oc-CCb liegenden Occludinreste R467-E468 haben ebenfalls keine Entsprechung in der Strukturvorlage. Durch neue zur Occludinsequenz homologe Loops aus einer Loopdatenbank wurden diese AS

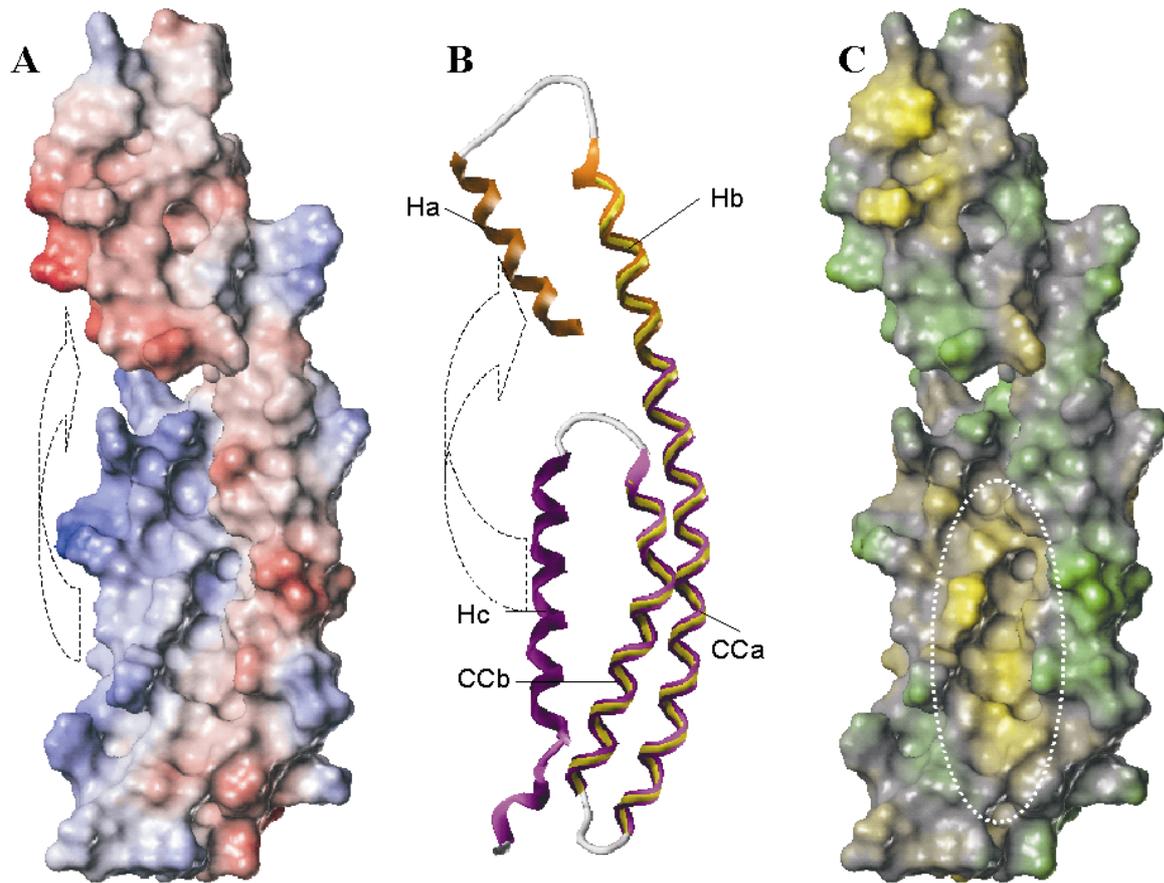
zwischen Oc-CCa und Oc-CCb eingefügt und auch die verkürzten Helices Oc-CCb und Oc-Hc neu verbunden. Am C-Terminus wurde das Modell im Vergleich zu 1DOV um fünf Aminosäuren (DRRKP) in helikaler Konformation verlängert, da die  $\alpha$ -Cateninvorlage dort zu kurz war. N-terminal (Occludin<sub>406-435</sub> entspricht Oc-Ha, -Hb) wurde das Modell mit einem Strukturfragment aus einem Vierhelixbündel des humanen STAT-1-Proteins (PDB: 1BF5<sub>278-306</sub>) verlängert, was einer negativ geladenen Helix-Turn-Helix Region entspricht. Da die CC-Vorhersage Oc-CCa und einen Großteil von Oc-Hb umfasste, wurde dort eine durchgehende Helix postuliert und die Fragmente der Vorlagen entsprechend verbunden. Das erhaltene Modell weist deutlich darauf hin, dass Occludin sehr wahrscheinlich eine Helixbündelfaltung ähnlich wie  $\alpha$ -Catenin einnimmt (Abb.3.9).



**Abb. 3.9.** Schema des Occludinmonomermodells mit farblicher Kennzeichnung der Herkunft der für die Modellierung wichtigen Bereiche (zu den dazugehörigen Sequenzen und Abkürzungen siehe Abb.3.2). Die Strichellinie zeigt an, wo die beiden Strukturvorlagen von STAT-1-Protein (orange) und  $\alpha$ -Catenin verbunden wurden. Im Bereich der  $\alpha$ -Cateninstrukturvorlage sind Bereiche der besten (violett) und schwächeren (blau) Sequenzähnlichkeit unterschieden. Gegenüber der Strukturvorlage veränderte Loopregionen sind grau dargestellt.

Die Darstellung des elektrostatischen Potentials an der Oberfläche des Occludinmonomers zeigt zwei negativ geladene Bereiche (gebildet von Ha und dem Turn zwischen CCa/CCb) an den beiden Enden des Bündels. Auf der einen Seite des Helixbündels (Abb. 3.10.A rechts) sind sie verbunden durch negative Ladungen in CCa, während sie auf der anderen Seite durch einen von der Helix Oc-Hc gebildeten positiven Bereich unterbrochen wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Helix Oc-Hc mit ihren meist basischen Aminosäuren in einer Occludinstruktur umklappt und statt mit Oc-CCb wie in dem Modell gezeigt mit der sauren Helix Oc-Ha interagiert (Pfeil in Abb. 3.10.A). Die Darstellung des lipophilen

Potentials zeigt zwischen den drei Helices aus der  $\alpha$ -Cateninvorlage eine hydrophobe Tasche (Abb. 3.10.C).

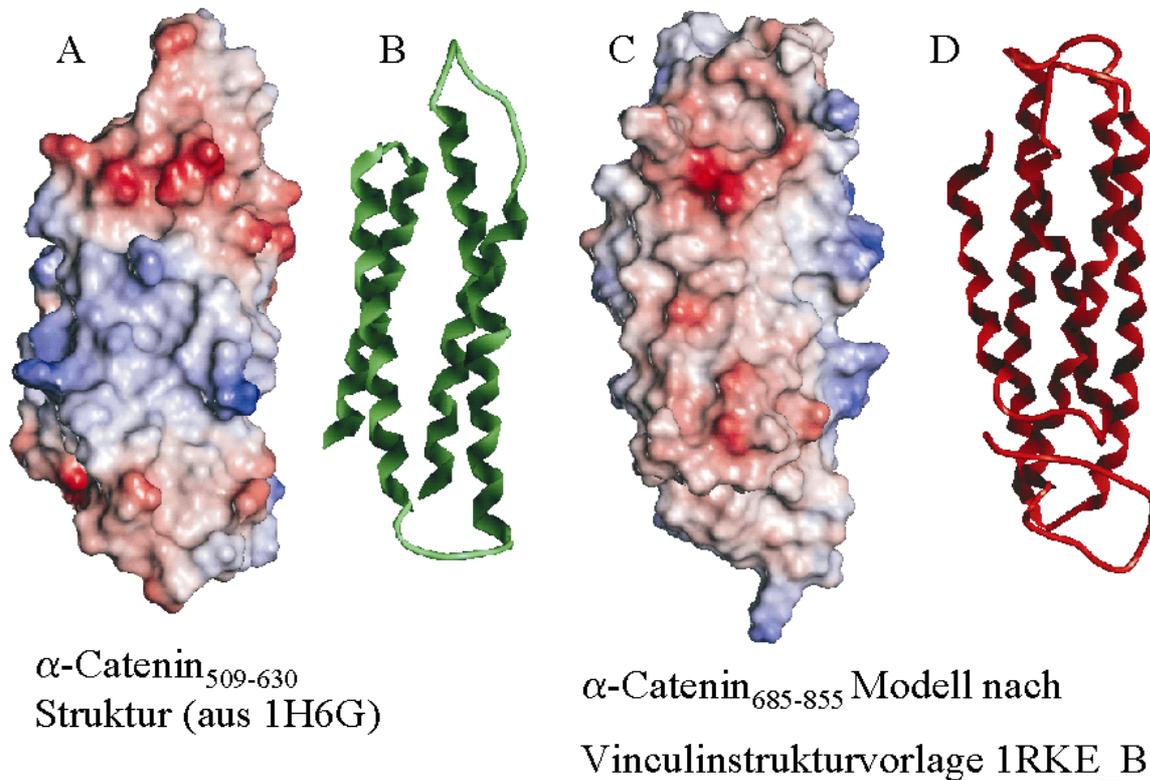


**Abb. 3.10.** Darstellung des Occludinmonomermodells. **A)** Elektrostatische Potentialoberfläche (rot = negative Ladungen; blau = positive Ladungen). Die Ladungsverteilung erlaubt die Vermutung, dass die basische Helix Hc in Richtung der sauren Helix Ha umklappen könnte (gestrichelter Pfeil) und so zwei langgestreckte Helices (Hb und CCa sowie CCb und Hc) entstehen könnten. **B)** Bänderdarstellung des Proteinrückgrats (Abkürzungen nach Abb. 3.2 mit Darstellung der Bereiche aus 1BF5 (orange), 1DOV (magenta) und der modifizierten Loopregionen (grau). Bereiche mit CC-Vorhersage sind durch ein gelbes inneres Band markiert **C)** Lipophile Potentialoberfläche (gelb = lipophil; grün = hydrophil) wobei der hervorgehobene lipophile Bereich (Oval) besonders bedeutsam erscheint.

### 3.2.2. Strukturen und Monomermodelle von $\alpha$ -Catenin

Die bekannten Strukturbereiche (VH1, VH2, VH3) vom  $\alpha$ -Catenin wurden bereits unter Punkt 3.1.2. erläutert (Abb. 3.3). Da in der Literatur (Imamura et al., 1999) eine Bindung von ZO-1 an  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> gezeigt worden war, interessierte uns dieser Bereich hinsichtlich des Vergleichs der ZO-1-Bindung von Occludin und  $\alpha$ -Catenin besonders. Für den N-terminalen Teil dieser Region ( $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub>, entspricht C-terminaler Hälfte von VH2) gibt es bereits bekannte Kristallstrukturen (Abb. 3.3), während für den VH3-Bereich von  $\alpha$ -Catenin ein Modell basierend auf der Vinculinstruktur 1RKE (Izard et al., 2004) erstellt wurde. Das

elektrostatische Potential an der molekularen Oberfläche von  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> (1H6G) weist wie das Occludinmonomer an beiden Enden eines Vierhelixbündels negativ geladene Bereiche auf (Abb.3.11.A). Das elektrostatische Potential des Modells von  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> zeigt einen langgestreckten sauren Bereich auf einer Seite (Abb. 3.11.C Vorderseite).



**Abb. 3.11.** Darstellung der Kristallstruktur  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> (aus PDB-Nr. 1H6G in **A**, **B**; Sequenz in 1H6G vom Menschen, aber im betrachteten Bereich identisch zur Maus-Sequenz) und von einem Modell der VH3-Region von Maus- $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> (**C**, **D**) basierend auf der Vinculinstruktur 1RKE\_B. Elektrostatische Oberflächen (**A**, **C**: rot = negative Ladungen, blau = positive Ladungen) und Proteinrückkraddarstellungen (**B**, **D**).

### 3.2.3. ZO-1-Monomermodell

Als Strukturvorlage für das ZO-1 Modell wurde die beste der in Punkt 3.1.3. gefundenen Strukturen, die SH3-Hinge-GUK-Struktur von PSD-95 (PDB-Nr. 1KJW) benutzt. Die hohe Sequenzähnlichkeit (45%) zwischen Maus-ZO-1<sub>518-806</sub> und Ratten-PSD-95<sub>430-724</sub> ist noch ausgeprägter, wenn nur die SH3- oder GUK-Domäne verglichen wird, da die einzigen größeren Abweichungen zwischen den beiden MAGUK-Proteinen in der Hingeregion zwischen SH3 und GUK und in der GMP-Bindungsregion der GUK-Domäne liegen (Abb. 3.7; Tabelle 3.5).

Im Homologiemodell für ZO-1 wurde die Hingeregion auf zwei Arten modifiziert. In der Strukturvorlage (1KJW) folgte auf den  $\beta$ -Strang D der SH3-Domäne eine  $\alpha$ -Helix als Beginn der Hingeregion, wo bei klassischen SH3-Domänen nach einem 180°-Turn gleich der  $\beta$ -

Strang E käme. Diese Helix wurde in Übereinstimmung mit der Sekundärstrukturvorhersage von ZO-1 verlängert (mit PDB: 1EPU<sub>170-181</sub>). Als zweite Veränderung wurde die vorhergesagte CC1-Helix (auf der CC-Vorlage PDB: 1A92<sub>17-45</sub>) in die Hingeregion eingesetzt. Der zur GMP-Bindungsregion von PSD-95 homologe Bereich in ZO-1 ist viel kürzer und weist auch keine Sequenzähnlichkeiten zu PSD-95 auf. Deshalb wurde dieser Bereich durch Einsetzen eines zu ZO-1 homologen Fragmentes (PDB: 1E6Y\_C<sub>134-154</sub>) modelliert (Abb. 3.12).

**Tabelle 3.5.** Vergleich der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten zwischen ausgewählten Bereichen von Maus-ZO-1 mit den in der PDB gefundenen Strukturvorlagen berechnet nach der *blossum62* Matrix mit Programm GAP (aus SEQLAB).

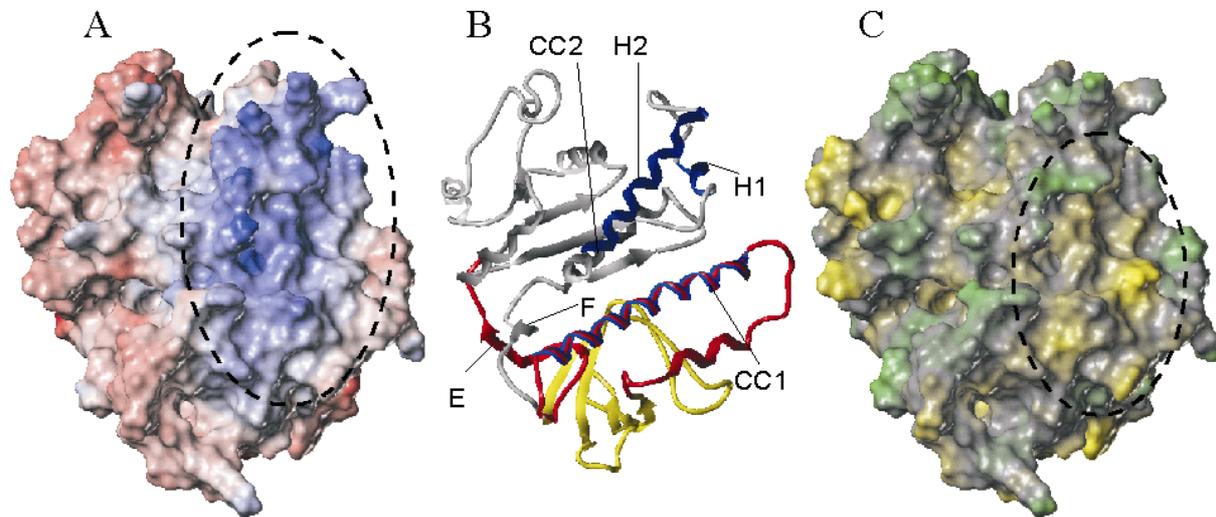
Protein-Strukturelement	Sequenzbereich	Vorlage (Protein, PDB-Nr. und Sequenznummern)	% Identität	% Ähnlichkeit
GUK	ZO-1 644-812	PSD-95 (1KJW) 534-724	31,9	45,0
SH3 A-E mit Hinge	ZO-1 518-643	PSD-95 (1KJW) 430-533	31,3	40,4
SH3 A-D	ZO-1 518-575	PSD-95 (1KJW) 430-489	40,0	50,9



**Abb. 3.12.** Ausschnitte aus dem Sequenzvergleich in Abb. 3.7. von ZO-1 mit PSD-95 (1KJW) mit zusätzlich benutzten Fragmentstrukturvorlagen für die Konstruktion der Hingeregion (PDB: 1EPU<sub>170-181</sub> und 1A92<sub>17-45</sub>) und der GMP-Bindungsregion (1E6Y\_C<sub>134-154</sub>) im ZO-1-Monomermodell. Im Modell nicht benutzte Bereiche der Fragmente sind mit kleinen Buchstaben bezeichnet. Angegeben sind jeweils auch die in den benutzten Fragmentstrukturen vorliegenden Sekundärstrukturen (SS) (H= Helix; B=  $\beta$ -Strang). (D) und (E) sind die entsprechenden  $\beta$ -Stränge aus 1KJW am Ende der SH3-Domäne (D) und in der Hingeregion (E). Färbung der AS siehe Abb. 3.1.

Die CC-Helix CC1 in der Hingeregion und die  $\alpha$ -Helices H1 und H2 von GUK enthalten einen Überschuss von positiven Ladungen und sind laut dem Modell in räumlicher Nähe auf der Oberfläche der SH3-GUK-Einheit lokalisiert. Sie erzeugen auf der molekularen Oberfläche der SH3-GUK Einheit einen großen Bereich mit starkem positiven elektrostatischen Potential. Dabei liegen CC1 und H2 fast parallel nebeneinander und weisen in dieselbe Richtung, während H1 unterhalb und etwa in einem rechten Winkel zu H2

positioniert ist. Im lipophilen Potential sieht man etwa bei CC1 einen gewissen hydrophoben Bereich an der Oberfläche (Abb. 3.13).

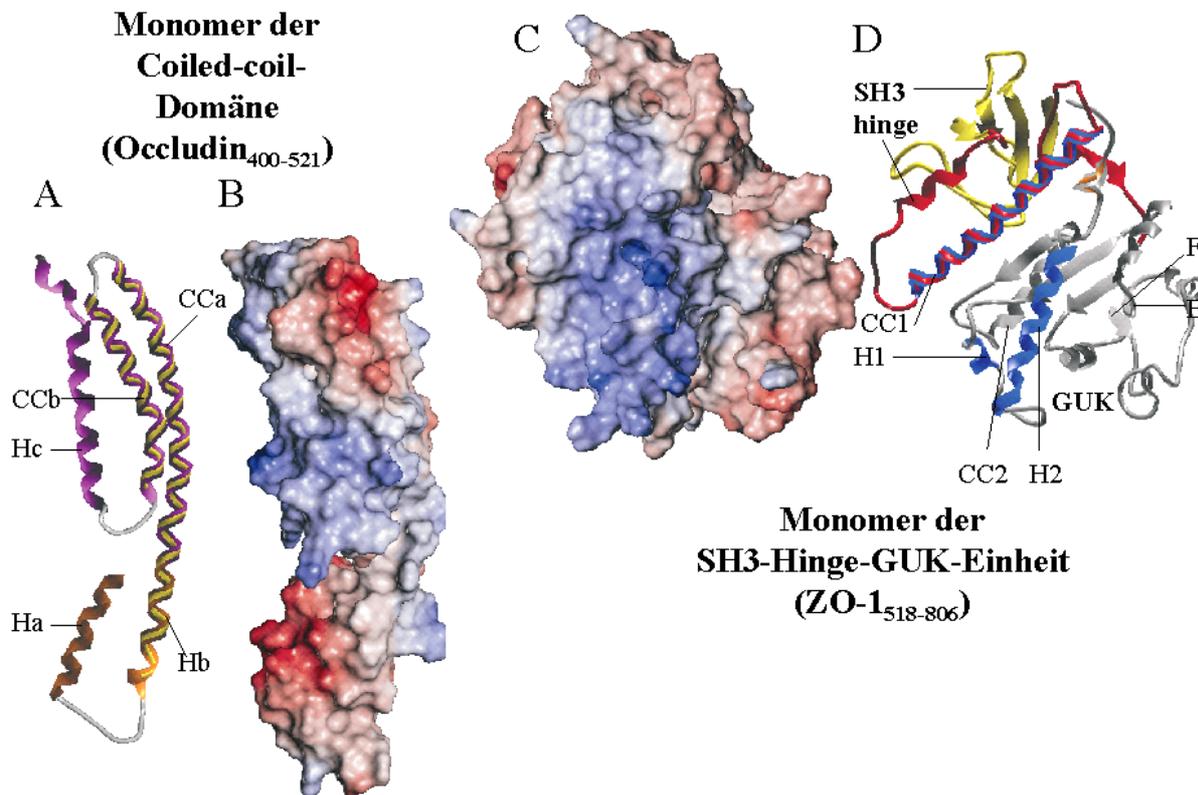


**Abb. 3.13.** Darstellung des ZO-1-Monomermodells der SH3-Hinge-GUK-Einheit (Maus-ZO-1<sub>518-806</sub>). **A)** Elektrostatische Potentialoberfläche (rot = negative Ladungen, blau = positive Ladungen) mit einem markanten basischen Bereich (Oval) gebildet hauptsächlich von CC1, H1 und H2. **B)** Bänderdarstellung des Proteinrückgrats: SH3-Domäne = gelb; GUK-Domäne = grau; Hingeregion = rot; H1 und H2 = blau; CC1 = rot/blau. Zur Lage der beschrifteten Strukturelemente innerhalb der ZO-1-Sequenz und Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 3.7. **C)** Lipophile Potentialoberfläche (gelb = lipophil; grün = hydrophil) mit einem lipophilen Bereich (Oval), der hauptsächlich von CC1 gebildet wird.

### 3.2.4. Schlussfolgerungen aus den Monomermodellen für die Interaktion von Occludin/ZO-1 und $\alpha$ -Catenin/ZO-1

Wenn man die bisher erarbeiteten Monomermodelle und erhaltenen Informationen zusammen betrachtet, zeichnen sich Hinweise ab, dass die Interaktion von Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin mit ZO-1 über mögliche elektrostatische Interaktionen mit vorwiegend sauren Bindungsmotiven auf der Seite von Occludin/ $\alpha$ -Catenin und einem basischen Bereich auf der Seite von ZO-1 erfolgen könnte. Die bekannten Strukturen von  $\alpha$ -Catenin der VH1-Region und der N-terminalen Hälfte von VH2 haben eher basische elektrostatische Oberflächen, was erklären würde, warum  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub> nicht an ZO-1 binden (Imamura et al., 1999). Die Bindungsbereiche werden hauptsächlich von helikalen Strukturen gebildet, wobei wahrscheinlich auch Coiled coil-Wechselwirkungen beteiligt sind. Eine Gegenüberstellung der Monomermodelle von Occludin<sub>400-521</sub> und ZO-1<sub>518-806</sub> zeigt keine gute Übereinstimmung von Form- und Ladungskomplementarität (Abb. 3.14). Die sauren Bereiche an den beiden Enden des Occludinmodells sind jeweils deutlich kleiner als die basische Region des ZO-1-Modells. Sie liegen aber zu weit voneinander entfernt, um gleichzeitig an ZO-1 zu binden.

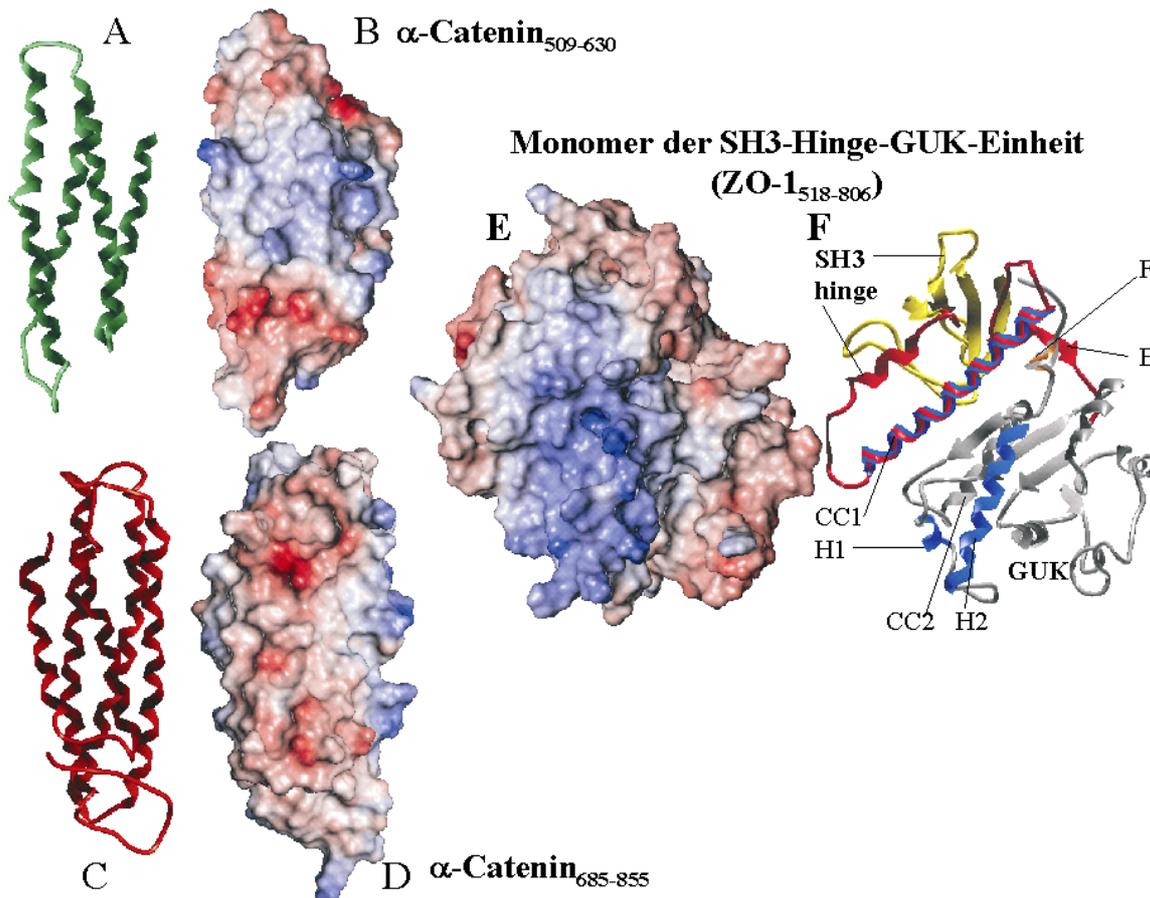
Durch Oligomerisierung der beiden Proteine könnten sich die Interaktionsflächen möglicherweise so verändern, dass die beschriebene Interaktion von Occludin und ZO-1 erfolgt (Fanning et al., 1998), aber die vorliegenden Modelle sprechen eher gegen eine Wechselwirkung im Verhältnis 1:1.



**Abb. 3.14.** Maßstabsgetreue Gegenüberstellung der Monomer-Architekturmodelle von Maus-Occludin<sub>400-521</sub> (**A**, **B**) und der SH3-Hinge-GUK-Einheit von Maus-ZO-1<sub>518-806</sub> (**C**, **D**) als potentielle Interaktionspartner. Dargestellt sind jeweils eine Bänderdarstellung des Proteinrückrads (**A**, **D**) und die elektrostatische Potentialoberflächen (**B**, **C**; rot = negative Ladungen, blau = positive Ladungen). Für Abkürzungen und Details der Einfärbungen des Occludinmodells siehe Abb. 3.10 und des ZO-1-Modells siehe Abb. 3.13. Die elektrostatischen Potentiale der monomeren Occludindomäne (**B**) und der monomeren ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Einheit (**C**) zeigen kein optimales komplementäres Muster, was gegen eine 1:1-Interaktion spricht.

Die Gegenüberstellung der Monomermodelle von  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> und ZO-1<sub>518-806</sub> zeigt hingegen eine wesentlich bessere Übereinstimmung von Form- und Ladungskomplementarität (Abb. 3.15). Hier besitzen die sauren bzw. basischen Interaktionsbereiche etwa die gleiche Größe. Sie werden beide hauptsächlich von jeweils zwei nebeneinanderliegenden  $\alpha$ -Helices gebildet (zwei der Helices aus dem Helixbündel von  $\alpha$ -Catenin und die Helices CC1 und H2 mit der kleinen H1 bei ZO-1). Laut Literatur (Imamura et al., 1999) ist die Bindung von ZO-1 an  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> etwa genauso stark wie an das kürzere Konstrukt  $\alpha$ -Catenin<sub>631-906</sub>. Das Modell ( $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub>) enthält nicht die ganze Sequenz dieses Konstrukts, aber erklärt die

Bindung schon recht gut. Es ist möglich, dass andere  $\alpha$ -Cateninsequenzen auch noch an einer ZO-1-Bindung beteiligt sind. Der schon kristallisierte Bereich  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> (Abb.3.15.B) hat ebenfalls einige saure Bereiche an der Oberfläche, die potentiell an ZO-1 binden könnten, obwohl sie hinsichtlich Form und Größe nicht so gut zu ZO-1 passen, wie das  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub>-Modell (Abb. 3.15.D).



**Abb. 3.15.** Maßstabsgetreue Gegenüberstellung der Kristallstruktur  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> (aus PDB-Nr. 1H6G in **A**, **B**; Sequenz in 1H6G vom Menschen, aber im betrachteten Bereich identisch zur Maus-Sequenz), sowie von Monomer-Architekturmodellen der VH3-Region von Maus- $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> (**C**, **D**) und der SH3-Hinge-GUK-Einheit von Maus-ZO-1<sub>518-806</sub> (**E**, **F**) als potentielle Interaktionspartner. Dargestellt sind je eine Bänderdarstellung des Proteinrückrads (**A**, **C**, **F**) und die elektrostatische Potentialoberflächen (**B**, **D**, **E**; rot = negative Ladungen, blau = positive Ladungen). Für Abkürzungen und Details der Einfärbungen des ZO-1-Modells siehe Abb. 3.13. Die elektrostatischen Potentiale des  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub>-Modells (**D**) und der monomeren ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Einheit (**E**) zeigen ein optimales komplementäres Muster, was für eine 1:1-Interaktion spricht.

### **3.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den monomeren Homologiemodellen von Occludin, $\alpha$ -Catenin und ZO-1**

Die Modelle ergeben verschiedene Bindungsbereiche für Occludin (Ha, CCa, CCb) und ZO-1 (CC1, H1, H2), sowie mehrere saure Helices in  $\alpha$ -Catenin. Diese hypothetischen Bereiche sollen in den folgenden Experimenten bestätigt werden. Daneben zeigten die Monomermodelle von Occludin und ZO-1 nur eine suboptimale Interaktion. Eine bessere Wechselwirkung könnte bestehen, wenn Oligomerisierungsprozesse mitberücksichtigt werden. Es gibt Hinweise, dass sowohl der C-terminale Teil von Occludin (Nusrat et al., 2000b) als auch die SH3-GUK-Domäne von ZO-1 (Schmidt et al., 2004) Oligomere bilden können. Auch diese homotypischen Interaktionen sollen im Weiteren näher untersucht werden. Mit den experimentellen Daten können die Modelle später verfeinert werden.

### **3.3. Studieren der Proteinbindungen mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie**

Aus den unter 3.2. beschriebenen Modellen wurden Hypothesen über konkrete Wechselwirkungsorte abgeleitet. Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden so angelegt, um diese Hypothesen zu validieren. Mit den Ergebnissen werden dann die Modelle weiter präzisiert oder wo nötig modifiziert. Von Occludin,  $\alpha$ -Catenin und ZO-1 wurden rekombinante Deletionskonstrukte hergestellt, die verschiedene der unter Punkt 3.1. und 3.2. genannten Strukturelemente enthalten oder ausschließen, und mit der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie auf ihre Bindung miteinander getestet. Dabei wurden, wenn nicht anders erwähnt, für alle drei Proteine die entsprechenden Maus-Sequenzen verwendet.

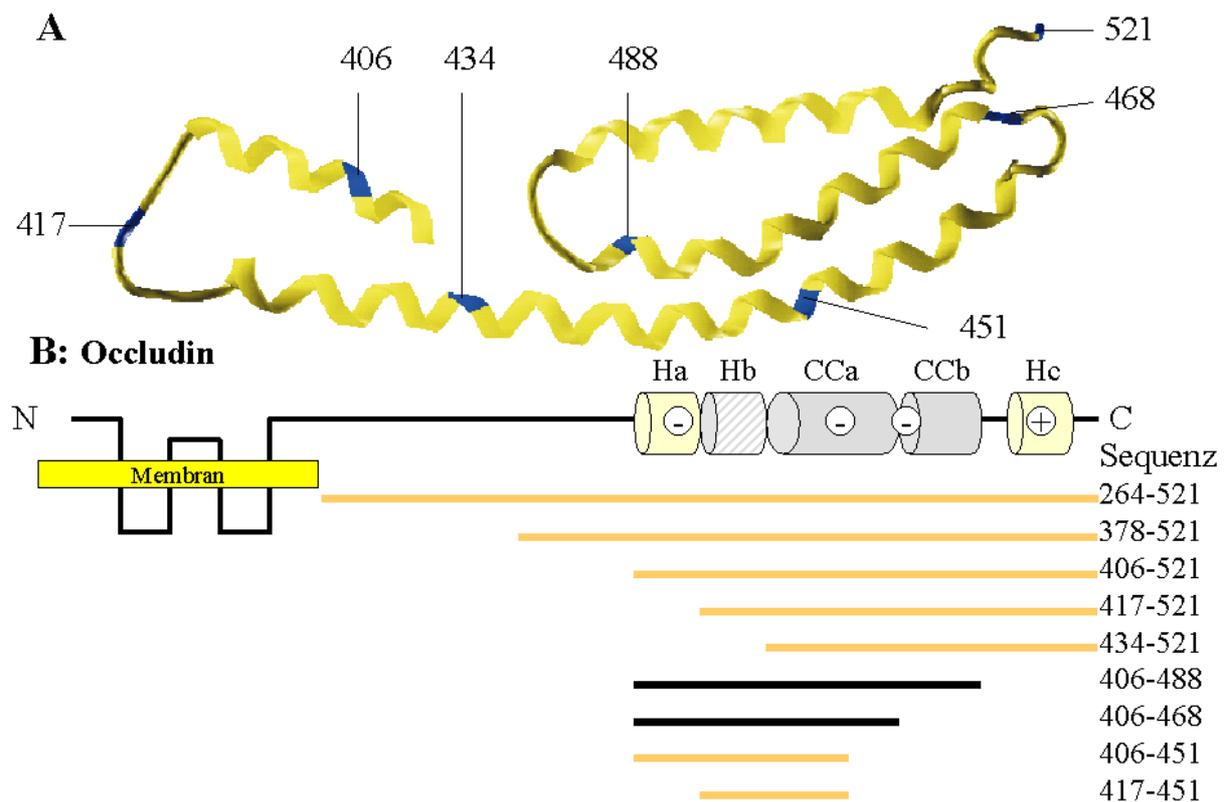
#### **3.3.1. Untersuchung der ZO-1/Occludin-Interaktion**

Um den ZO-1-bindenden Bereich von Occludin einzugrenzen, wurden Konstrukte erzeugt und untersucht, die systematisch nach den vorhergesagten Sekundärstrukturelementen variiert bzw. gekürzt wurden. Es wurde die Technik der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) eingesetzt. Wenn nicht anders erwähnt wurden die Konstrukte rekombinant als MBP-Fusionsproteine erzeugt. Ein Konstrukt des gesamten zytosolischen C-Terminus von Occludin (Occludin<sub>264-521</sub>) war bei der Reinigung instabil und wurde nicht weiter untersucht, da sich die ZO-1-Bindung auf die C-terminalen 150 AS beschränkt (Fanning et al., 1998). Ein bereits vorliegendes Konstrukt (Occludin<sub>378-521</sub>, Schmidt et al., 2001) entspricht etwa den C-terminalen 150 AS, die schon früher als ZO-1-Bindungsregion von Occludin identifiziert wurden. Die Grenzen der im Weiteren erzeugten Verkürzungsmutanten von Occludin, wurden in Übereinstimmung mit den Sekundärstrukturgrenzen des Occludinmodells aus 3.2.1.

gewählt (Abb. 3.16). Diese kürzeren Konstrukte waren beim Aufreinigen stabil, was für eine korrekt gefaltete Struktur spricht.

Bei den folgenden Messungen wurden jeweils die Occludinfragmente immobilisiert (meist ~2000 RU) und danach die Bindung von ZO-1-Konstrukten mit der SPR-Technik ermittelt.

Die ZO-1-Konstrukte wurden hauptsächlich in Konzentrationen von 0,5-10  $\mu\text{M}$  eingesetzt.



**Abb. 3.16.** Schematische Darstellung der verschiedenen verwendeten Occludinkonstrukte **A)** Lage der Start- oder Endpunkte (als blau markierte AS) der Occludinkonstrukte im Monomermodell von Maus-Occludin<sub>400-521</sub>. **B)** Vergleich der Occludinkonstruktsequenzen mit einem Schema der vorhergesagten Sekundärstrukturen in Occludin (Sequenz und Abkürzungen siehe Abb. 3.2). In den weißen Kreisen ist die vorherrschende Ladung der einzelnen Elemente zu sehen (- für negativ, + für positiv). Die am besten bindenden Fragmente von Occludin (schwarze Linien) enthielten die  $\alpha$ -helikalen Elemente Ha, Hb, CCa sowie CCb und haben einen Überschuss an negativen Ladungen.

Wegen Assoziation der ZO-1-Konstrukte in der Lösung konnte nicht mehr von einer 1:1-Interaktion ausgegangen werden und die gemessenen Kurven ließen sich auch nicht an eine entsprechend berechnete Bindungskurve fitten. Deshalb war eine sinnvolle Berechnung von Bindungskonstanten nicht möglich. Um dennoch wenigstens relative Aussagen über die Stärke der Interaktion treffen zu können, wurden unter Standardbedingungen gebundene Analytmengen miteinander verglichen (siehe Abschnitt 2.2.2). Durch eine Normierung auf 100 fmol immobilisierten Ligand war die Sättigung der Bindungsstellen auf dem Sensorchip gut abschätzbar. Bei einer 1:1-Interaktion von immobilisiertem Ligand A mit dem im Puffer

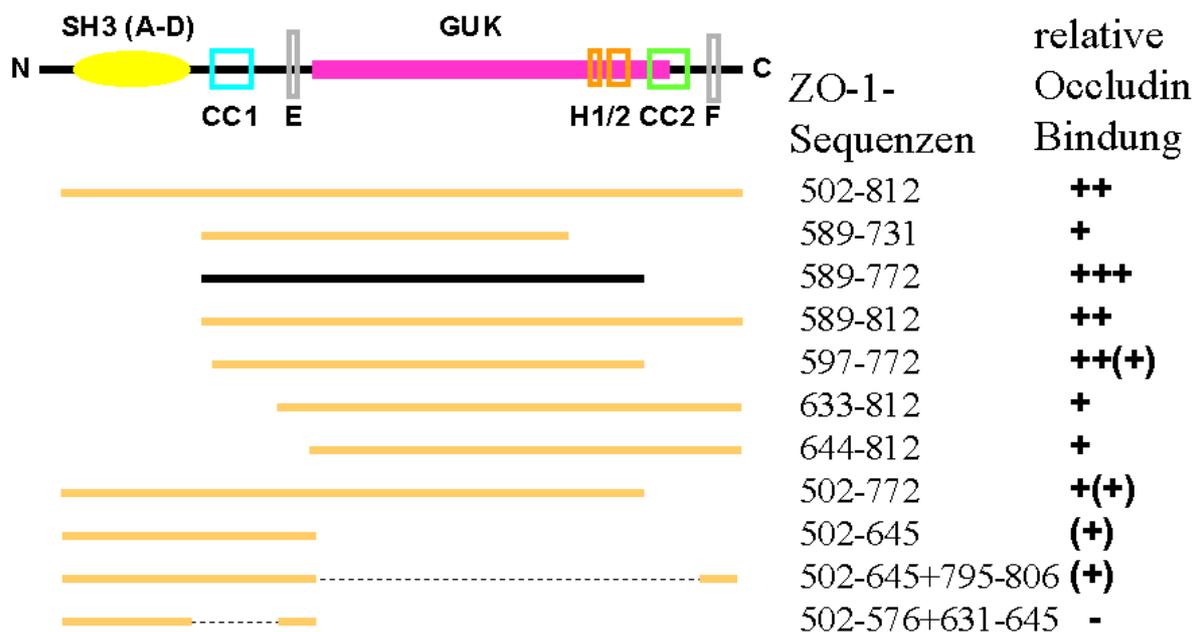
gelösten Analyt B sollten bei immobilisierten 100 fmol A in der Sättigung auch 100 fmol von B binden. Wenn sich weniger von B anlagert, weist das darauf hin, dass nicht alle Moleküle von A für eine Interaktion frei zugänglich sind. Dies war auch bei unseren Messungen der Fall, wo die normierten Werte für B bei maximal ~60 fmol lagen. Wegen sterischer Behinderung durch die Immobilisierung und möglicher Denaturierung einiger Proteinmoleküle sind aber immer suboptimale Bedingungen zu erwarten. Diese errechneten Werte gehen von ZO-1-Monomeren in der Lösung aus. Falls wie erwartet wirklich ZO-1-Oligomere als Komplexe mit an die immobilisierten Occludinmoleküle binden, weist das auf noch weniger freie Bindungsstellen hin. Beim Immobilisieren der Proteine durch die verwendete unspezifische Aminokopplung wird immer ein Teil der Ligandenmoleküle so an die Dextrane des Sensorchips gekoppelt werden, dass sie für die in der Lösung befindlichen Analytmoleküle sterisch nicht mehr zugänglich sind. Um eine ausreichende Signalstärke der Experimente zu erhalten, wurde bis auf wenige Messungen immer Occludin immobilisiert und die ZO-1-Konstrukte als Analyt darüber gegeben.

**Tabelle 3.6.** Normierte Bindungsergebnisse (Occludin<sub>406-521</sub> als 100%) von ZO-1-Konstrukten an verschiedene immobilisierte Occludinsequenzen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (MW) und die mittleren Standardabweichungen (SEM). Die Anzahl der Messungen betrug immer mindestens 4. Die Bindungswerte der zwei jeweils am besten bindenden Occludinfragmente sind fettgedruckt.

Occludin-Sequenz	ZO-1644-812		ZO-1589-812		ZO-1589-772	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
378-521	54	3	60	3	64	2
406-521	100	0	100	0	100	0
417-521	69	8	83	2	90	2
434-521	22	1	25	2	37	4
406-488	<b>155</b>	9	<b>153</b>	10	<b>148</b>	6
406-468	<b>169</b>	10	<b>162</b>	14	<b>136</b>	5
406-451	152	22	123	6	116	12
417-451	97	6	100	5	116	17

Zum besseren Vergleich der verschiedenen Konstrukte untereinander wurde Occludin<sub>406-521</sub>, das alle vorhergesagten Sekundärstrukturen (Oc-Ha, Oc-Hb, Oc-CCa, Oc-CCb, Oc-Hc) enthält, als Standard benutzt und die ZO-1-Bindungsergebnisse der anderen Occludinkonstrukte darauf bezogen (Tabelle 3.6). Eine N-terminale Verlängerung (um Occludin<sub>378-405</sub>, in der keine Sekundärstruktur vorhergesagt wird) der Occludin Coiled coil-Domäne führte zu einer starken Abnahme der ZO-1-Interaktion. Dieser unstrukturierte Bereich könnte sich teilweise an die Bindungsstelle anlagern und sie so für ZO-1 maskieren. N-terminale Deletion von Oc-Ha und Oc-Hb von der Coiled coil-Domäne verminderte, ein Abschneiden von Oc-Hc vom C-Terminus hingegen erhöhte die Bindung. Dabei ist

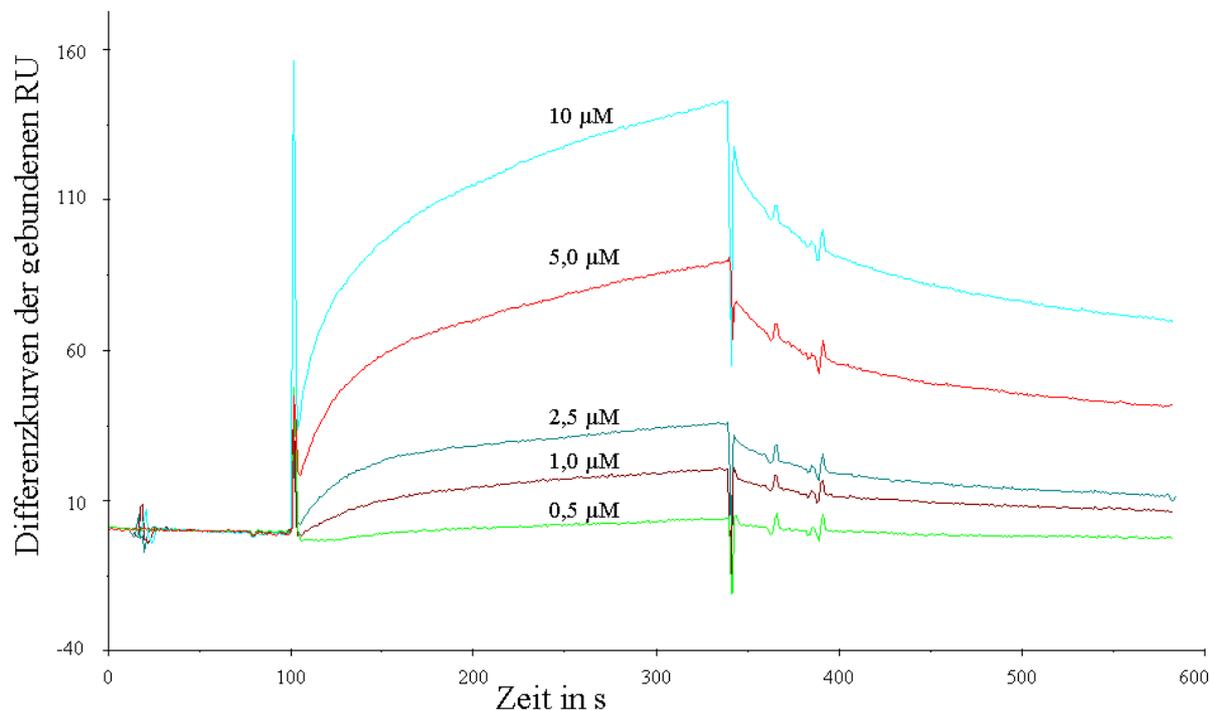
wahrscheinlich bedeutsam, dass Ha negativ Hc hingegen positiv geladen ist. Weitere Verkürzungskonstrukte zeigten, dass die essentielle Bindungsregion dem Bereich Occludin<sub>406-488</sub> entspricht, welcher die Helices Oc-Ha, Oc-Hb, Oc-CCa und Oc-CCb enthielt (Abb. 3.16). Die CC-Region von Occludin ist sehr wichtig für die Interaktion. Wird zuviel davon entfernt (Occludin<sub>406-451</sub>) nimmt die Interaktion wieder ab. Auch bei diesem kleineren Konstrukt führt eine Deletion von Oc-Ha (Occludin<sub>417-451</sub>) zu einer weiteren Verringerung der ZO-1-Anlagerung. Die ermittelten relativen Occludinbindungseigenschaften waren bei allen drei untersuchten ZO-1-Konstrukten ähnlich. An Occludin<sub>406-488</sub> und Occludin<sub>406-468</sub> erfolgte die beste und an Occludin<sub>434-521</sub> die schwächste Interaktion. Die absolut gemessenen Bindungsmengen waren am höchsten bei ZO-1<sub>589-772</sub> gefolgt von ZO-1<sub>589-812</sub> und ZO-1<sub>644-812</sub>. Dies zeigt die Bedeutung der Hinge-Region mit der CC1-Helix für die Bindung, die bei ZO-1<sub>644-812</sub> fehlt. Die Wechselwirkung von ZO-1-Konstrukten an Occludin<sub>378-521</sub> wurde schon früher in unserer Gruppe untersucht (Schmidt et al., 2004). Die dabei erhaltenen Daten sind vergleichbar mit meinen ZO-1-Bindungsdaten an Occludin<sub>406-521</sub> (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17.** Relative Occludinbindung verschiedener ZO-1-Konstrukte. Die ZO-1-Sequenzen sind zur Veranschaulichung als Linien mit Bezug zu einem Schema (von Abb. 3.7) der in ZO-1 laut dem Modell vorhandenen Sekundärstrukturelementen dargestellt. Das am besten bindende Fragment ZO-1<sub>589-772</sub> (schwarze Linie) enthielt CC1 sowie H1 und H2 aber nicht CC2. Die zwei letzten Konstrukte enthalten die  $\beta$ -Stränge F bzw. E, die über einen kurzen Linker (symbolisiert durch die Strichellinie aus den Aminosäuren VDGNGN bzw. V DGN) mit dem Rest des Proteins verbunden.

Die maximale Bindungsintensität zu allen Occludinkonstrukten wurden mit ZO-1<sub>589-772</sub> erreicht (Abb. 3.17). Der deutliche Unterschied der Bindungsstärke zwischen ZO-1<sub>589-772</sub> und

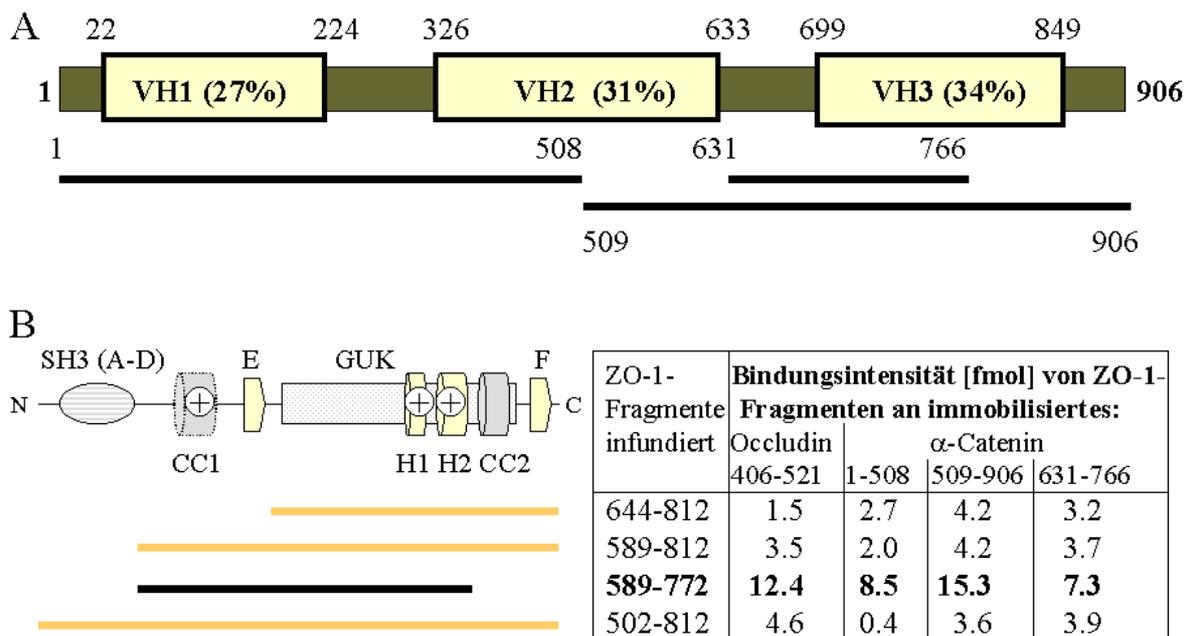
ZO-1<sub>589-731</sub> beweist die Wichtigkeit der H1/H2 Region. Generell zeichnen sich folgende Trends ab. Eine zweite Bindungsregion für Occludin, die CC1-Helix in der Hingeregion, bewirkt ebenfalls die Verbesserung der Bindungseigenschaften in den sie enthaltenen Konstrukten. Die Konstrukte mit nur jeweils einem dieser Motive zeigen nur schwache Wechselwirkungen. Nur mit beiden Motiven ist die Bindung stark. Nachdem die Kristallstruktur mit der SH3-GUK-Einheit von PSD-95 erschienen war, bestand die Möglichkeit, dass auch die SH3-Domäne von ZO-1 durch eine homologe Interaktion mit ihrer GUK-Domäne interagiert und möglicherweise auch die Bindung an die GUK-Domäne modifiziert. Konstrukte mit SH3-Domäne (ZO-1<sub>502-812</sub> und ZO-1<sub>502-772</sub>) zeigten schwächere Wechselwirkungen als solche mit Hingeregion aber ohne SH3 (ZO-1<sub>589-812</sub> und ZO-1<sub>589-772</sub>). Die Ergebnisse zweier zusammengesetzter Konstrukte, wo jeweils die  $\beta$ -Stränge E bzw. F über einen Linker an die SH3-Domäne gekoppelt wurden, zeigten nur schwache oder bei Deletion der Hingeregion gar keine Interaktion mit Occludin. Dies bestätigt die Bedeutung der vermuteten Interaktionsmotive (CC1; H1/H2). Ein Beispiel einer SPR-Bindungskurve ist sichtbar in Abb. 3.18.



**Abb. 3.18.** SPR-Bindungskurven verschiedener Konzentrationen von ZO-1<sub>589-812</sub> an Occludin<sub>406-521</sub> (Hier 1814 RU = 31,8 fmol des MBP-Occludin-Konstruktes immobilisiert). Dargestellt ist die Messkurve nach Subtraktion der Blankkurve. Durch leichte Verschiebungen der Kurven ergeben sich dabei Spitzen bei Beginn (100 s) und Ende (340 s) der Probeninjektion.

### 3.3.2. ZO-1-Bindung an verschiedene $\alpha$ -Cateninkonstrukte

Um die Wechselwirkung von ZO-1 mit  $\alpha$ -Catenin zu analysieren, benutzten wir die Konstrukte  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub>, die der VH1-Region mit der ersten Hälfte von VH2 bzw. der 2. VH2-Hälfte und VH3 entsprechen. Zusätzlich wurde  $\alpha$ -Catenin<sub>631-766</sub>, ein verkürztes Konstrukt von VH3 mit einer CC-Vorhersage und Sequenzähnlichkeit zu Occludin, untersucht. Die beste Bindung von ZO-1 gab es an  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> (Abb. 3.19). Die Reihenfolge der Bindungsstärke der untersuchten ZO-1-Fragmente an  $\alpha$ -Catenin und an Occludin war etwa gleich, wobei ZO-1<sub>589-772</sub> an jeden der vier Liganden am besten band. Das Konstrukt  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> zeigte eine starke Bindung an ZO-1 und beinhaltete eine CC-Vorhersage (AS 678-707) mit einer Sequenzähnlichkeit (45%) zu Teilen von Oc-CCa (AS 440-468). In der VH1-Region von  $\alpha$ -Catenin wurden keine signifikanten CC-Vorhersagen gefunden, was mit den experimentellen Daten einer schwächeren Interaktion von ZO-1 an  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub> im Vergleich zu  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> übereinstimmt (Abb. 3.19.B).



**Abb. 3.19.** Gegenüberstellung der Bindungsmessungen von ZO-1 an Occludin<sub>406-521</sub> und drei verschiedene  $\alpha$ -Cateninkonstrukte. **A)** Schema der für die Bindungsmessungen verwendeten  $\alpha$ -Cateninkonstrukte im Vergleich zu den vinculinhomologen Regionen des  $\alpha$ -Catenins (siehe dazu auch Abb. 3.3). **B)** Bindungsvergleich (SPR) von verschiedenen ZO-1-Konstrukten an immobilisiertes Occludin<sub>406-521</sub> und drei verschiedene immobilisierte  $\alpha$ -Cateninkonstrukten. Die ZO-1-Konstrukte sind als Linien in Bezug auf ein Schema der ZO-1-Sekundärstrukturelemente (Symbole und Abkürzungen siehe Abb. 3.6 und Abb. 3.7) dargestellt. Das am besten bindende Konstrukt (ZO-1<sub>589-772</sub>) enthält die vorhergesagte Coiled coil-Helix CC1 und die  $\alpha$ -Helices H1 und H2 der GUK-Domäne mit einem Überschuss an positiven Ladungen (+ in weißen Kreisen) und zeigte ähnliche Bindungsintensitäten zu Occludin und den  $\alpha$ -Cateninsequenzen.

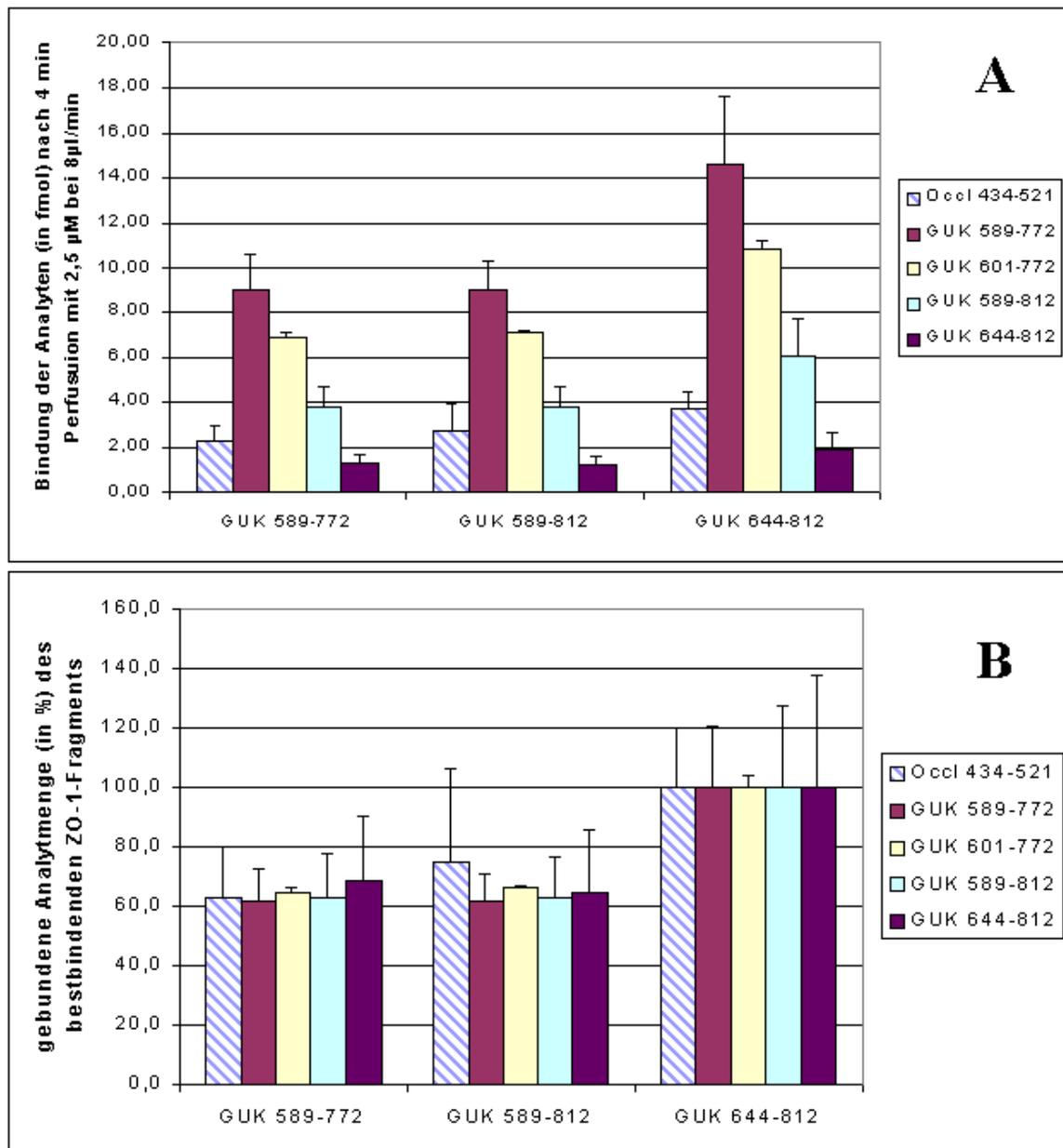
Interessanterweise zeigte die gesamte SH3-GUK-Einheit (ZO-1<sub>502-812</sub>) im Gegensatz zu den ZO-1-Konstrukten ohne SH3 kaum eine Bindung an  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub>. Möglicherweise sind im größeren Konstrukt und damit auch im nativen ZO-1 die entsprechenden Bindungsstellen von der SH3-Domäne verdeckt. Dies würde auch die Literaturergebnisse erklären, wo keine Wechselwirkung von ZO-1 mit  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub> beobachtet wurde (Imamura et al., 1999). Die schwächere ZO-1-Bindung an das verkürzte Konstrukt  $\alpha$ -Catenin<sub>631-766</sub> deutet darauf hin, dass nicht nur die CC Region allein, sondern die gesamte Helixbündelstruktur von VH3 für die Interaktion nötig ist.

### 3.3.3. Untersuchungen zu Homoassoziation verschiedener ZO-1-Konstrukte

Der Hauptschwerpunkt der Untersuchungen war die Interaktion von Occludin-ZO-1. Im Verlauf der SPR-Bindungsstudien wurde beobachtet, dass Fragmente von ZO-1-GUK an sich selbst binden. Dies erklärte auch, warum bei der ZO-1-Bindung an immobilisiertes Occludin (oder  $\alpha$ -Catenin) die Kurven nicht einer 1:1-Interaktion entsprachen, da aufgrund seiner Homoassoziation ZO-1 in der Lösung als Oligomer vorlag.

Es wurden zunächst drei verschiedene GUK-Konstrukte auf dem SPR-Chip immobilisiert (ZO-1<sub>589-772</sub>; ZO-1<sub>589-812</sub>; ZO-1<sub>644-812</sub>). Das erste (ZO-1<sub>589-772</sub>) entsprach dem unter 3.3.2. am besten bindend gefundenen Fragment an Occludin und  $\alpha$ -Catenin, das die Hingeregion und H1/H2 aber nicht CC2 enthielt. Das zweite Fragment (ZO-1<sub>589-812</sub>) schloss CC2 ein, während das dritte Fragment (ZO-1<sub>644-812</sub>) zwar CC2 aber nicht die Hingeregion umfasste. Diese drei Fragmente, sowie noch zusätzlich eines, das dem ersten Fragment bis auf eine etwas verkürzte Hingeregion glich (ZO-1<sub>601-772</sub>), wurden auch als Analyten über den oben beschriebenen Sensorchip injiziert. Die Bindungsstärken der vier Konstrukte an alle drei immobilisierten ZO-1-Fragmente hatte dieselbe Reihenfolge wie auch bei der Bindung an Occludin. Am besten band ZO-1<sub>589-772</sub>, worauf in absteigender Reihe ZO-1<sub>601-772</sub>, ZO-1<sub>589-812</sub> und zuletzt ZO-1<sub>644-812</sub> folgten. (bis auf ZO-1<sub>601-772</sub> siehe Abb. 3.17). Das nur schwach an ZO-1 bindende Occludin<sub>434-521</sub> (Tabelle 3.6) wurde zur Kontrolle ebenfalls mit injiziert. Überraschenderweise zeigte hier ZO-1<sub>644-812</sub> als immobilisierter Ligand die besten Bindungseigenschaften (100% gegenüber jeweils ~60% an ZO-1<sub>589-772</sub> und ZO-1<sub>589-812</sub>) aller untersuchten Konstrukte (Abb. 3.20.B). Wurde das gleiche Fragment (ZO-1<sub>644-812</sub>) hingegen als Analyt in Lösung eingesetzt, zeigte es die schwächste Bindung (Abb. 3.20.A). Diese Unterschiede lassen sich auf die Hingeregion zurückführen, die im Konstrukt ZO-1<sub>644-812</sub> im Gegensatz zu den anderen Fragmenten (ZO-1<sub>589-772</sub>; ZO-1<sub>589-812</sub>) fehlt. Eine Erklärung könnte sein, dass Fragmente, welche die Hingeregion enthalten, in Lösung stärker oligomerisieren. In den Oligomeren sind

die Interaktionsstellen der mittleren Monomere schon abgesättigt und nur an den Enden können sich neue Monomere anlagern.



**Abb. 3.20.** Homoassoziationen verschiedener ZO-1-GUK-Fragmente untereinander und zum Vergleich mit Occludin<sub>434-521</sub>. **A)** Bindung (in fmol) verschiedener Analyte (Konzentration je 2,5  $\mu\text{M}$ , 4 min Perfusion, Flussrate 8  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) an drei GUK-Fragmente. Die Werte wurden zum Vergleich auf eine Immobilisierungsmenge von je 100 fmol normalisiert (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=2). **B)** Werte von A normalisiert auf Bindung an ZO-1<sub>644-812</sub>.

Die immobilisierten Fragmente wurden zum Vergleich auf gleiche Molarität der Monomere normiert. Liegen einige Fragmente jedoch verstärkt als Oligomere vor, stehen dort nach der Immobilisierung im Vergleich weniger freie Interaktionsstellen zur Verfügung. Das könnte die Ergebnisse erklären. Wenn die Hingeregion wichtig für die Homoassoziation ist, erklärt es

die schwachen Bindungsergebnisse vom ZO-1<sub>644-812</sub> als Analyt (Abb. 3.20.A). Wenn ZO-1<sub>644-812</sub> wenig Eigenassoziation zeigt, stehen dort bei Verwendung als Ligand nach Immobilisierung einer gleichen molaren Menge mehr freie Bindungsstellen zur Verfügung. Das Anheften eines ZO-1-Oligomers an den Sensorchip bewirkt wegen der größeren Masse auch ein stärkeres SPR-Signal als die Bindung eines monomeren ZO-1-Konstruktes. Das könnte ebenfalls zu den stärkeren Bindungssignalen von ZO-1<sub>589-772</sub> und ZO-1<sub>589-812</sub> beitragen. Die genauen Bindungskonstanten konnten wegen der unbekanntenen Bindungsstöchiometrie nicht bestimmt werden. Generell scheint die Hingeregion in immobilisierten GUK-Fragmenten zu einer Reduktion der Wechselwirkung um ~40% zu führen, während das Vorhandensein oder Fehlen von CC2 und  $\beta$ -Strang F bei den GUK-Fragmenten keine Rolle für die Interaktion spielt.

Zum Vergleich der ZO-1-Bindung an Occludin,  $\alpha$ -Catenin und der Homoassoziation an ZO-1 wurden ausgewählte Konstrukte dieser drei Proteine nebeneinander auf einem Sensorchip immobilisiert und mit verschiedenen ZO-1-Fragmenten perfundiert (Tabelle 3.7). Für die Bindung an alle drei Proteine ist die Hingeregion und GUK-Domäne wichtig, da ein Konstrukt ohne diese beiden Bereiche (ZO-1<sub>502-576</sub> mit angefügtem  $\beta$ -Strang E<sub>631-645</sub>) in allen Fällen nahezu keine Interaktion zeigte. Die Hingeregion mit CC1 scheint für die Bindung an  $\alpha$ -Catenin keine Rolle zu spielen, da die Bindungswerte von Konstrukten mit (ZO-1<sub>589-772</sub>) und ohne (ZO-1<sub>644-772</sub>, ZO-1<sub>644-812</sub>) CC1 dort nahezu gleich sind. An Occludin bindet ZO-1<sub>589-772</sub> dagegen deutlich stärker als die Fragmente ohne CC1.

**Tabelle 3.7.** Vergleich der Bindungsergebnisse von ZO-1-Konstrukten (in fmol) an immobilisiertes Occludin<sub>406-521</sub>,  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> und ZO-1<sub>502-812</sub>. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse bei Perfusion von 2,5  $\mu$ M Analytlösung für 4 min bei einer Flussrate von 8  $\mu$ l/min. Die Werte sind auf eine Immobilisierungsmenge von je 100 fmol normiert.

perfundierte ZO-1-Konstrukte		immobilisiert		
ZO-1-Sequenz	enthaltene Elemente	Occludin 406-521	$\alpha$ -Catenin 509-906	ZO-1 502-812
589-772	CC1, H1, H2	95,6	17,3	19,0
644-772	H1, H2	20,6	16,8	10,4
644-812	H1, H2, CC2	25,7	18,7	17,0
502-812	SH3-GUK gesamt	33,7	14,8	11,0
502-803	SH3-GUK gesamt	35,8	14,8	12,5
502-794	SH3-GUK ohne Strang F	12,2	4,2	4,1
502-576+631-645	A-D, E ohne Hinge	0,6	0,0	0,5

Bei der Bindung verschiedener GUK-Konstrukte an SH3-GUK war wie schon bei GUK-GUK-Interaktionen ZO-1<sub>589-772</sub> das am besten bindende Fragment, während die Deletion der Hingeregion mit CC1 zu einer verschlechterten Bindung (ZO-1<sub>644-772</sub>) führte. Für die

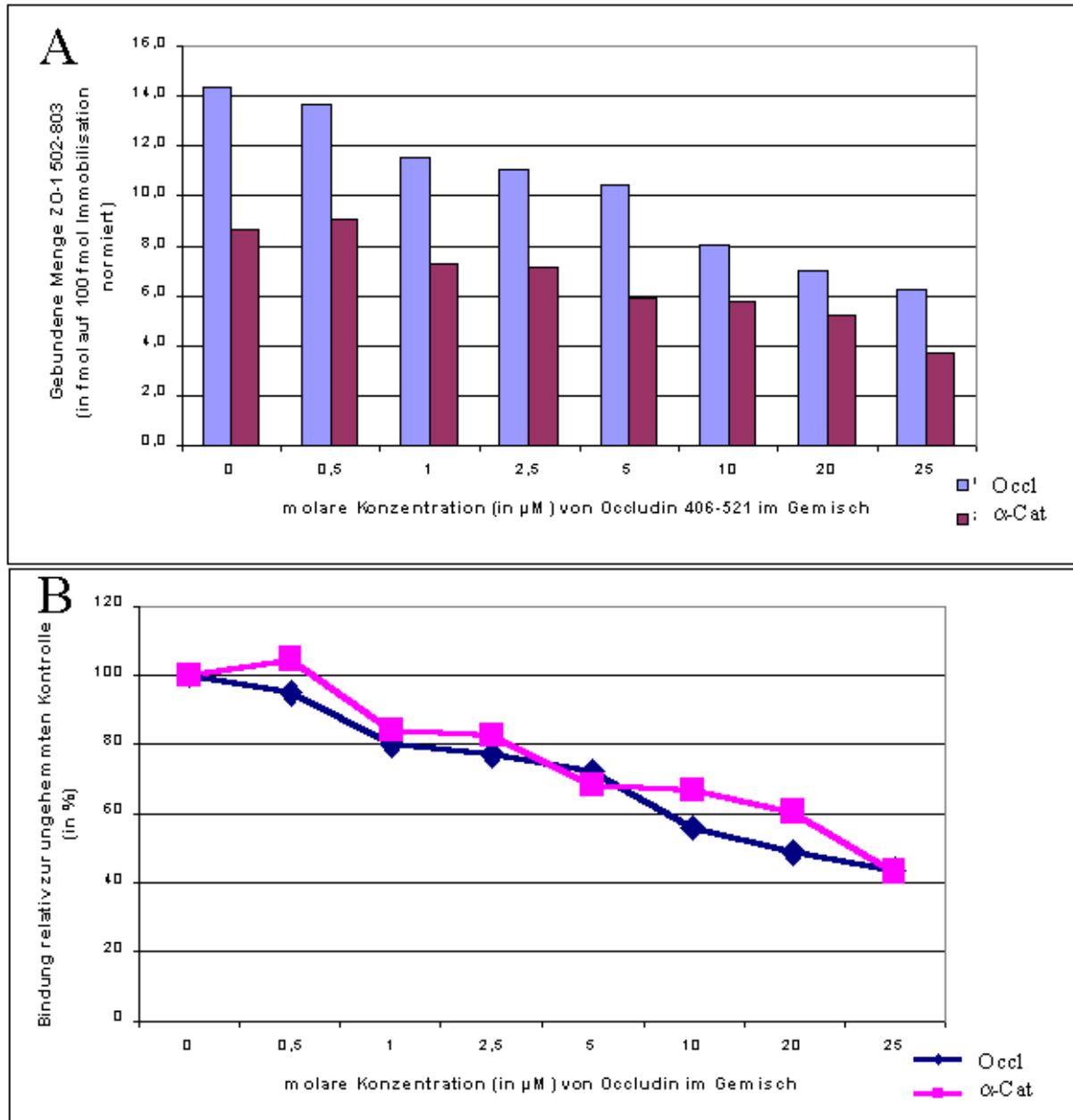
Wechselwirkung mit SH3-GUK ist, im Gegensatz zur Bindung an GUK allein, auch ein Bereich mit der CC2-Helix und dem  $\beta$ -Strang F bedeutsam. Dies zeigen die besseren Werte von ZO-1<sub>644-812</sub> im Vergleich zu ZO-1<sub>644-772</sub>. Die Homoassoziation von SH3-GUK-Konstrukten scheint hauptsächlich über  $\beta$ -Stranginteraktionen (möglicherweise sogar mit Domänaustausch) zu erfolgen. Das Konstrukt ZO-1<sub>502-794</sub> ohne den  $\beta$ -Strang F bindet deutlich schwächer als Konstrukte, die diesen  $\beta$ -Strang enthalten (ZO-1<sub>502-812</sub>, ZO-1<sub>502-803</sub>).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die SPR-Technik nicht sehr geeignet ist, solche Selbstinteraktionen zu untersuchen, da man an der Signalstärke nicht unterscheiden kann, ob z.B. zehn Einzelmoleküle oder ein Decamer bindet. Die Tatsache, dass eine Oligomerisierung von ZO-1-GUK beobachtet wurde, war ein Grund, mögliche Di- und Oligomerisierung näher zu untersuchen (Abschnitt 3.5) und dann zu modellieren (Abschnitt 3.6).

### **3.3.4. Eine Mischung von Occludin/ZO-1 in Lösung verringert die ZO-1-Bindung an immobilisiertes Occludin bzw. $\alpha$ -Catenin**

Um zu sehen, ob die Bindung von ZO-1 an Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin vom jeweils anderen Bindungspartner gehemmt werden kann, wurden Kompetitionsstudien durchgeführt. Occludin<sub>406-521</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> wurden auf demselben SPR-Sensorchip immobilisiert und immer mit der gleichen Konzentration ZO-1<sub>502-803</sub> perfundiert, wobei unmittelbar vor dem Messbeginn steigende Konzentrationen Occludin<sub>406-521</sub> dazugemischt wurden. Die beobachtete Hemmung der Wechselwirkung war dabei deutlich konzentrationsabhängig. Die relative Bindungshemmung von ZO-1 an Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin war etwa gleich (~40% bei 10  $\mu$ M Occludin im Gemisch), was auf vergleichbare Bindungskonstanten hindeutet (Abb. 3.21). Kontrollmessungen mit der im Gemisch verwendeten Occludinpräparation zeigten keine Interaktion mit dem immobilisierten  $\alpha$ -Catenin und nur sehr schwache Bindung an das immobilisierte Occludin (27,7  $\mu$ M Occludin<sub>406-521</sub> hatten 1,3 fmol normierte Bindung an Occludin). Deshalb muss die beobachtete Bindung des ZO-1/Occludin-Gemisches an den Chip allein von einer Anheftung von ZO-1 stammen. Wurde das Gemisch nicht sofort vermessen, sondern 20 min auf Eis inkubiert, nahm die Hemmung der ZO-1-Bindung noch einmal um etwa 10% zu. Analoge Resultate wurden auch mit 0,5  $\mu$ M ZO-1<sub>502-812</sub> als Analyt in den Mischungen erhalten. Die beobachteten Hemmungsraten blieben ebenfalls gleich, wenn statt des MBP-Fusionsproteins von Occludin<sub>406-521</sub> eine Probe benutzt wurde, bei der das MPB abgespalten war. Von  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> konnte nicht eine so hochkonzentrierte Präparation erzeugt werden wie von Occludin<sub>406-521</sub>. Eine Mischung von 0,5  $\mu$ M ZO-1<sub>502-812</sub> mit 4  $\mu$ M  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> zeigte jedoch eine etwa 20% Hemmung der Bindung an Occludin

und  $\alpha$ -Catenin im Vergleich zum reinen ZO-1<sub>502-812</sub>. Also bewirkt auch eine  $\alpha$ -Catenin/ZO-1 Mischung in Lösung durch das Maskieren von Bindungsstellen eine Hemmung der Interaktion von ZO-1 mit Occludin und  $\alpha$ -Catenin.



**Abb. 3.21.** Kompetitionsstudie mit immobilisiertem Occludin<sub>406-521</sub> (Occl) und  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> ( $\alpha$ -Cat) mit je 0,5  $\mu\text{M}$  ZO-1<sub>502-803</sub> als Analyt, jeweils unmittelbar vor der Messung mit 0-25  $\mu\text{M}$  Occludin<sub>406-521</sub> gemischt. **A)** Gebundene Menge ZO-1<sub>502-803</sub> (in fmol) normalisiert auf je 100 fmol immobilisierten Ligand (Occludin<sub>406-521</sub> bzw.  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub>) nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen Occludin<sub>406-521</sub>. **B)** Bindungswerte von A) normalisiert als Prozentsatz der nicht gehemmten Kontrollmessung (mit 0  $\mu\text{M}$  Occludin<sub>406-521</sub>).

### 3.3.5. Zusammenfassung der SPR-Ergebnisse

Durch die Untersuchung verschiedener Verkürzungsstrukture von Occludin konnte das Bindungsepitop zu ZO-1 auf den Bereich Occludin<sub>406-488</sub> mit den vorwiegend sauren Bindungsmotiven Ha, Hb, CCa, CCb eingegrenzt werden. Bei den ZO-1-Konstrukten bestätigte sich die Bedeutung der CC1- und H1/H2-Epitope, während CC2 anscheinend keinen Einfluss auf die Occludin/ZO-1-Interaktion hat. Die GUK-enthaltenden ZO-1-Konstrukte scheinen präferentiell mit der zweiten Hälfte von  $\alpha$ -Catenin zu interagieren, wobei die Bindungsintensitäten mit der Wechselwirkung an Occludin vergleichbar sind. Die Untersuchungen zeigen eine Homoassoziation von ZO-1, wobei wohl auch wieder die Hingeregion beteiligt ist. Die SPR-Methode ist jedoch nicht geeignet, genauere Angaben zu Homointeraktionen zu machen, da man die Anteile von der Oligomerisierung zwischen verschiedenen Molekülen in der Lösung und der Bindung von gelösten Molekülen an immobilisierte Moleküle auf der Chipoberfläche nicht trennen kann. Kompetitionsstudien zeigten, dass eine ausreichende Occludinkonzentration in der Lösung die ZO-1-Interaktion mit immobilisiertem Occludin und auch  $\alpha$ -Catenin verringern kann. Dies spricht ebenfalls für vergleichbare Bindungsintensitäten von Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin an ZO-1.

### 3.4. Analyse der Bindungsepitope in ZO-1, Occludin und $\alpha$ -Catenin

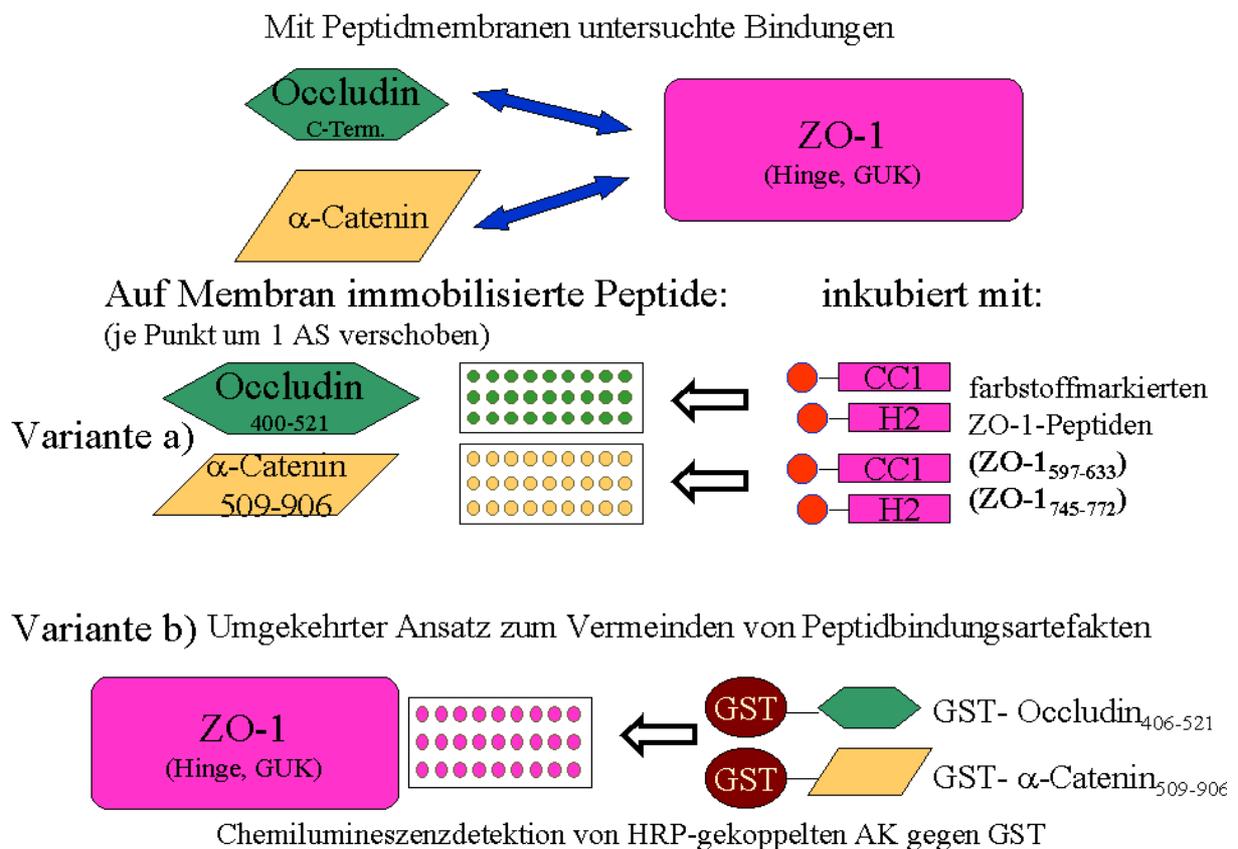
Bei diesen Studien wurden jeweils die Occludin/ZO-1 oder die  $\alpha$ -Catenin/ZO-1-Interaktion mithilfe von Peptidmembranen untersucht (Abb.3.22).

Um mögliche Artefakte durch nicht native Faltung der Peptide auszuschließen, wurden die Untersuchungen in zwei Varianten und mit zwei unterschiedlichen Detektionsmethoden durchgeführt. In Variante a) (siehe Abschnitt 3.4.1) wurden Occludin/ $\alpha$ -Catenin-Sequenzen als Peptide auf Membranen immobilisiert. Als Bindungspartner dienten hier mit einem roten Farbstoff gekoppelte Peptide aus ZO-1. In Variante b) wurden ZO-1-Sequenzen auf den Membranen synthetisiert, woran GST-Fusionsproteine von Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin banden. Die Detektion erfolgte mit enzymgekoppelten Anti-GST-Antikörper. Wo sich diese anhafteten, entstand ein Chemilumineszenzsignal. (Zum besseren Verständnis wie die Peptidsequenzen auf den Membranen variiert worden sind siehe Anhang S.156).

#### 3.4.1. ZO-1-Peptide binden ähnliche Epitope in Occludin und $\alpha$ -Catenin

Um die Bindungsepitope der interagierenden ZO-1-Elemente CC1 und H2 detaillierter einzugrenzen, wurden Untersuchungen mit systematisch variierten Sequenzen von Occludin<sub>400-521</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> durchgeführt. Die zwei ZO-1-Peptide (CC1 und H2)

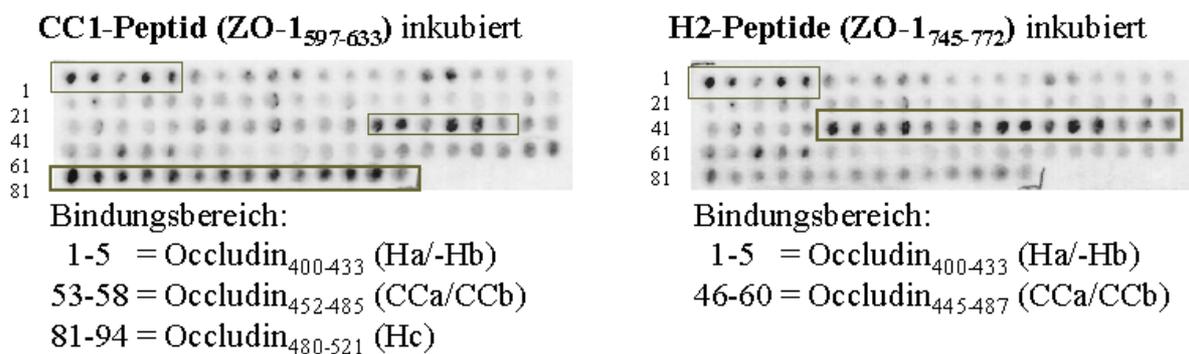
zeigen teilweise überlappende Bindungsbereiche an Occludinpeptiden (Abb. 3.23), jedoch mit Unterschieden im Oc-Hc-Bereich. Im Gegensatz dazu war das beobachtete Interaktionsmuster der beiden Peptide mit  $\alpha$ -Catenin nahezu gleich (Abb. 3.24). Bei  $\alpha$ -Catenin wurde zusätzlich noch die Bindung eines ZO-1-Peptids studiert, was die Sequenz der im Modell beschriebenen  $\alpha$ -Helix H1 umfasst. Zur genaueren Analyse der Bindungsergebnisse werden im Folgenden die jeweils von den ZO-1-Peptiden erkannten Sequenzen von Occludin und  $\alpha$ -Catenin miteinander verglichen. In Klammern werden dabei die korrespondierenden Peptidpunkte auf den Membranen aus Abb. 3.23 bzw. 3.24 genannt.



**Abb. 3.22.** Schema der durchgeführten Peptidmembranexperimente mit Occludin (grün),  $\alpha$ -Catenin (gelbbraun) und ZO-1 (magenta). Es sind die zwei verwendeten Varianten **a)** und **b)** dargestellt. Links sind dabei die jeweils auf den Membranen immobilisierten Proteinsequenzen abgebildet, während rechts die dazugegebenen Bindungspartner zu sehen sind.

CC1 und H2 banden beide an Occludin<sub>400-433</sub> (Punkte 1-5), was laut dem Modell den Helices Oc-Ha/-Hb entsprach. Auch im Bereich der CC-Vorhersage (Oc-CCa/-CCb) zeigten beide Peptide eine Wechselwirkung, wobei jedoch der erkannte Bereich bei H2 mit Occludin<sub>445-487</sub> (Punkte 46-60) größer war als bei CC1 mit Occludin<sub>452-485</sub> (Punkte 53-58). Dafür zeigte CC1 im Gegensatz zu H2 eine Bindung an Occludin<sub>480-521</sub> (Punkte 81-93), was der Helix Oc-Hc entsprach. Die Sequenz von Occludin weist im Bereich von Ha, sowie von CCa bis zur Mitte

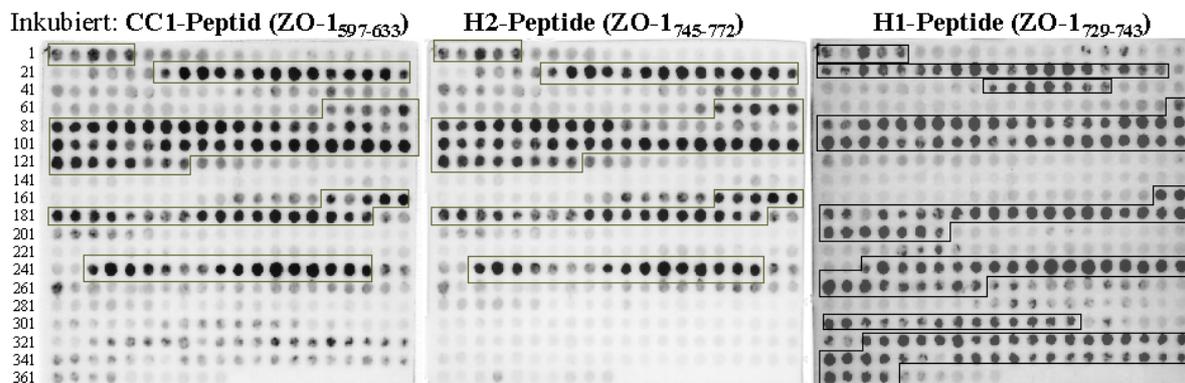
von CCb einen Überschuss an negativen Aminosäuren auf, während der Hc-Bereich basisch geladen ist (Abb. 3.2). Diese Daten zeigen, dass die ZO-1-Peptide CC1 und H2 mit den CC-Epitopen Oc-CCa/Oc-CCb und den  $\alpha$ -Helices Oc-Ha/-Hb der Coiled coil-Domäne von Occludin interagieren. Da die Bedeutung von  $\alpha$ -Catenin erst im Laufe der Untersuchungen klar wurde, erfolgte die Synthese der entsprechenden Membranen und die Peptidbindungsexperimente rund ein Jahr später als bei Occludin. Erst hier wurde auch das H1-Peptid in die Untersuchungen mit aufgenommen.



**Abb. 3.23.** Bindung der Peptide ZO-1<sup>597-633</sup> und ZO-1<sup>745-772</sup> an punktförmig membrangebundene Peptide aus Occludin<sub>400-521</sub>. ZO-1<sup>597-633</sup> und ZO-1<sup>745-772</sup> enthielten die vorhergesagte CC-Helix CC1 aus der Hingeregion bzw. die  $\alpha$ -Helix H2 aus der GUK-Domäne und waren zur Detektion mit dem roten Farbstoff Tetramethylrhodamin gekoppelt. Jeder Punkt der gezeigten Membranen enthielt ein 29 AS langes Peptid, wobei die Sequenz von Punkt zu Punkt um je eine Aminosäure verschoben ist (z. B. Punkt 1: Occludin<sub>400-428</sub>, Punkt 2: Occludin<sub>401-429</sub>). Die Rechtecke markieren zusammenhängende Bereiche hoher Bindungsaffinität. Die Interaktion der Peptide an Occludin wies besonders im Bereich Hc (Punkte 81-94) Differenzen auf. (Abkürzungen siehe Abb. 3.2).

Eine Wiederholung der Peptidmappingexperimente mit den Occludinsequenzmembranen nach etwa einem Jahr bestätigte die oben genannten Ergebnisse für die Bindung von CC1 und H2. Die beobachteten Wechselwirkungen waren jedoch viel schwächer als früher. Möglicherweise war die Peptidmembran durch die lange Lagerung geschädigt worden. Das H1-Peptid wies hier nur eine schwache Anlagerung an Occludin<sub>480-521</sub> auf (Punkte 81-93). Das ist nicht gezeigt, da dieses Resultat wegen der in den Wiederholungsexperimenten mit CC1 und H2 gefundenen allgemeinen Abschwächung der Bindungsfähigkeit der Membran nicht sehr aussagekräftig ist. Die Interaktion mit den immobilisierten Peptidpunkten von  $\alpha$ -Catenin ergab für die beiden ZO-1-Peptide CC1 und H2 nahezu identische Resultate. Die in der VH2-Region von  $\alpha$ -Catenin erkannten Bereiche entsprachen den Aminosäuren 509-541, 535-576 und 584-664 (Punkte 1-5, 27-40, 76-128). In den bekannten Kristallstrukturen von  $\alpha$ -Catenin (Abb. 3.3) bilden diese Bereiche Helices. Das nächste gefundene Bindungsepitop  $\alpha$ -Catenin<sub>684-734</sub> (Punkte 176-198) reicht teilweise in die VH3-Region hinein und enthielt eine

Sequenz ( $\alpha$ -Catenin<sub>678-707</sub>) mit einer CC-Vorhersage (Tab. 3.2). Das letzte identifizierte Epitop  $\alpha$ -Catenin<sub>684-734</sub> (Punkte 176-198) liegt gänzlich in der VH3-Region. Nach dem in Abschnitt 3.2.2. beschriebenen Modell der VH3-Region von  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> bestehen die beiden letztgenannten ZO-1-Bindungsgebiete in  $\alpha$ -Catenin ebenfalls aus Helices.



Bindungsbereiche für die CC1- und H2-Peptide

- 1-5 =  $\alpha$ -Catenin<sub>509-541</sub> (VH2)
- 27-40 =  $\alpha$ -catenin<sub>535-576</sub> (VH2)
- 76-128 =  $\alpha$ -Catenin<sub>584-664</sub> (VH2 und Verbindungsregion zu VH3)
- 176-198 =  $\alpha$ -Catenin<sub>684-734</sub> (z.T. VH3 ab Position 699 lt. Abb.3.3)
- 243-258 =  $\alpha$ -Catenin<sub>751-794</sub> (VH3)

Bindungsbereiche für H1-Peptid

- 1-5 =  $\alpha$ -Catenin<sub>509-541</sub> (VH2)
- 21-39 =  $\alpha$ -catenin<sub>529-575</sub> (VH2)
- 80-120 =  $\alpha$ -Catenin<sub>588-656</sub> (VH2 und Verbindungsregion zu VH3)
- 179-207 =  $\alpha$ -Catenin<sub>687-743</sub> (z.T. VH3 ab Position 699 lt. Abb.3.3)
- 243-269 =  $\alpha$ -Catenin<sub>751-805</sub> (VH3)
- 301-314 =  $\alpha$ -Catenin<sub>809-850</sub> (VH3)
- 323-364 =  $\alpha$ -Catenin<sub>831-900</sub> (z.T. VH3 bis Position 849 lt. Abb.3.3)

**Abb. 3.24.** Bindung der Peptide ZO-1<sub>597-633</sub>, ZO-1<sub>745-772</sub>, und ZO-1<sub>729-743</sub> an punktförmig membrangekoppelte Peptide aus  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub>. ZO-1<sub>597-633</sub> enthielt die vorhergesagte CC-Helix CC1 aus der Hingeregion, während ZO-1<sub>745-772</sub> und ZO-1<sub>729-743</sub> die  $\alpha$ -Helix H2 bzw. die kürzere H1 aus der GUK-Domäne umfassten. Alle drei ZO-1-Peptide waren zur Detektion mit dem roten Farbstoff Tetramethylrhodamin gekoppelt. Jeder Punkt der gezeigten Membranen enthielt ein 29 AS langes Peptid, wobei die Sequenz von Punkt zu Punkt um je eine Aminosäure verschoben ist (z. B. Punkt 1:  $\alpha$ -Catenin<sub>509-537</sub>, Punkt 2:  $\alpha$ -Catenin<sub>510-538</sub>). Die Rechtecke markieren zusammenhängende Bereiche hoher Bindungsaffinität. Zu beachten ist, dass die CC1- und H2-Peptide dieselben immobilisierten  $\alpha$ -Cateninsequenzen auf der Membran erkennen. Das deutet auf gleiche Bindungseigenschaften und – epitope hin. Die Interaktion des H1-Peptids mit  $\alpha$ -Catenin wies dagegen Differenzen auf, besonders durch zusätzliche Bindungen in der VH3-Region. (Zur Lage der VH-Regionen in  $\alpha$ -Catenin siehe Abb. 3.3).

Die meisten der erkannten Peptidpunkte von  $\alpha$ -Catenin hatten eine negative Nettoladung, wohingegen die beiden ZO-1-Peptide positiv geladen waren. Diese fünf Epitope wurden mit leichten Verschiebungen der Grenzen auch vom H1-Peptid gebunden (Abb. 3.24). Da sich für zwischen zwei benachbarten Punkten auf der Membran, die Sequenz nur um je 1 AS verschiebt, werden also hier immer noch nahezu dieselben  $\alpha$ -Cateninbereiche identifiziert. Im

Unterschied zu CC1 und H2 erkennt das H1-Peptid zusätzlich die zwei C-terminal gelegenen Bereiche  $\alpha$ -Catenin<sub>809-850</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>831-900</sub> (Punkte 301-314, 323-364). Diese tragen im Gegensatz zu den anderen im  $\alpha$ -Catenin gefundenen Bindungssequenzen eine positive Nettoladung. Die Peptide CC1, H1 und H2 haben einen Überschuss an basischen Aminosäuren. Sie unterscheiden sich jedoch in der Länge und der AS-Zusammensetzung (Tabelle 3.8). Die gefundenen Ladungsverhältnisse der Peptide CC1 und H2 können die meisten der beobachteten Interaktionen erklären, aber nicht die Bindung von CC1 an den Oc-Hc Bereich und von H1 an die zwei C-terminalen  $\alpha$ -Cateninepitope, da dort bei beiden Partnern basische Eigenschaften dominieren. Bei diesen Peptiden spielen wahrscheinlich hydrophobe Wechselwirkungen die Hauptrolle.

**Tabelle 3.8.** Analyse der Aminosäurezusammensetzung der ZO-1-Peptide CC1, H1 und H2. Die Peptide wurden zur Kopplung an den Farbstoff Tetramethylrhodamin N-terminal mit einem Cystein und zwei  $\beta$ -Alaninen (in grau) synthetisiert. Die Aminosäuren (AS) der Sequenzen ZO-1<sub>597-633</sub>, ZO-1<sub>729-743</sub> und ZO-1<sub>745-772</sub> (in schwarz) der Peptide wurden nach dem Charakter der Seitenketten in verschiedene Typen (basisch, sauer, hydrophob, klein, hydrophil) eingeteilt. Durch den Ein-Buchstaben-Code ist angegeben, welche AS welcher Gruppe zugeordnet wurden. In der Tabelle sind jeweils die absoluten und prozentualen Anteile der verschiedenen AS-Gruppen dargestellt.

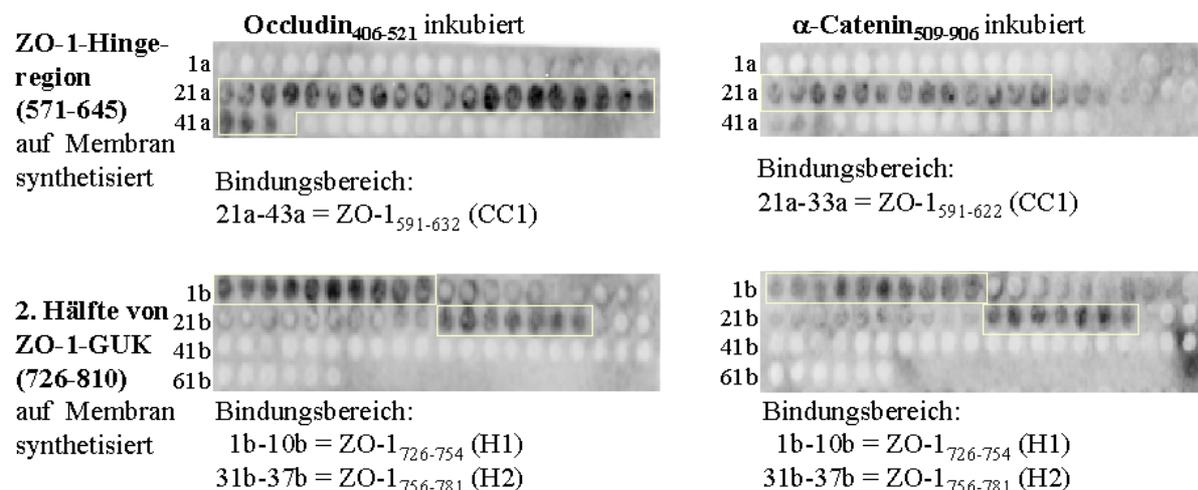
Peptid	ZO-1-AS-Nr.	Peptidsequenz				
CC1	597-633	C- $\beta$ A- $\beta$ A-DRADFWRFRGLRSSKRNLRLKSREDLSAQPVQTKFPAY				
H1	729-743	C- $\beta$ A- $\beta$ A-NPDSKQGVKTMRMRL				
H2	745-772	C- $\beta$ A- $\beta$ A-PESRKSARKLYERSHKLKNNHHLFTTT				
Anzahl der verschiedenen AS-Typen						
AS-Charakter	basisch	sauer	hydrophob	klein	hydrophil	
AS-Code	H,K,R	D,E	F,I,L,M,V,W,Y	A,C,P,G	S,T,Q,N	Summe
CC1	10	4	10	6	8	38
H1	4	1	4	2	4	15
H2	11	2	5	2	8	28
Anteile der verschiedenen AS-Typen in % am Gesamtpeptid						
AS-Charakter	basisch	sauer	hydrophob	klein	hydrophil	
AS-Code	H,K,R	D,E	F,I,L,M,V,W,Y	A,C,P,G	S,T,Q,N	Summe %
CC1	26,3	10,5	26,3	15,8	21,1	100
H1	26,7	6,7	26,7	13,3	26,7	100
H2	39,3	7,1	17,9	7,1	28,6	100

Durch unspezifische oxidative Kopplung können freie Cysteine bei solchen Peptidmembranexperimenten Bindungsartefakte erzeugen. Um dies auszuschließen, wurden alle Peptide auf den Membranen mit  $\alpha$ -Cateninsequenzen, die ein Cystein enthielten, in parallelen Experimenten auch mit Serin statt Cystein synthetisiert. Dies betrifft in der untersuchten Maus- $\alpha$ -Cateninsequenz die Cysteine 720, 767, 772, 787 und 793. Bei sonst gleicher Sequenz ergaben sich für die C=>S mutierten Peptidpunkte analoge Bindungsergebnisse, wie in Abb. 3.24 für die nativen cysteinhaltigen Peptidpunkte beschrieben.

Bei der Synthese der Peptidmembran von Maus-Occludin (Abb. 3.23) wurden die Cysteinpositionen 408 und 499 ebenfalls durch Serin ersetzt. Das zeigt, dass die Resultate nicht durch die Bildung von Disulfidbrücken beeinflusst sind.

### 3.4.2. Occludin und $\alpha$ -Catenin erkennen gleiche Epitope in ZO-1

In weiteren Experimenten wurden ZO-1-Peptide aus der Hingeregion und GUK-Domäne auf Membranen synthetisiert. Die Bindung von GST-Occludin<sub>406-521</sub> und GST- $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> wurde mittels Chemilumineszenz von Anti-GST-HRP-Antikörpern detektiert. Beide Proteinkonstrukte zeigten eine Interaktion mit ZO-1<sub>726-754</sub> und ZO-1<sub>756-781</sub> (Punkte 1b-10b, 31b-37b; Abb. 3.25), was den ZO-1-Elementen H1 und H2 entspricht. Verglichen mit Occludin scheint die Bindung von GST- $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> an die ZO-1-CC1-Region schwächer zu sein. Der von  $\alpha$ -Catenin gebundene Bereich war auch kürzer (ZO-1<sub>591-622</sub> = Punkte 21a-33a) als das von Occludin erkannte Bindungsepitop (ZO-1<sub>591-632</sub> = Punkte 21a-43a). Die wichtigste Aussage bleibt aber, dass Occludin und  $\alpha$ -Catenin mit den gleichen ZO-1-Epitope interagieren. Das ist ein klarer Beweis für einen gemeinsamen Bindungsmechanismus.

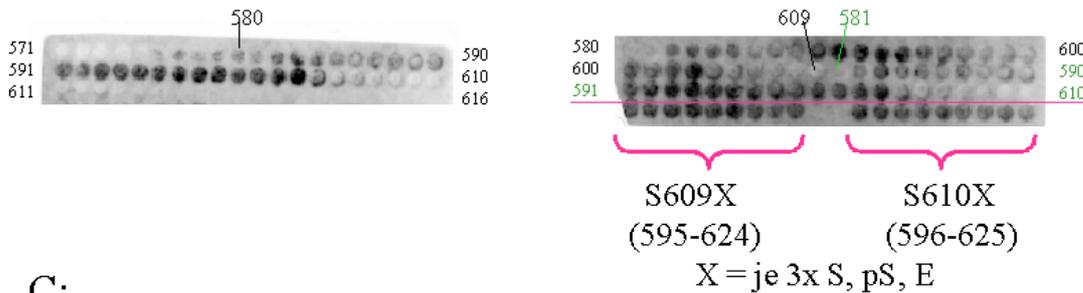


**Abb. 3.25.** Bestimmung der Occludin- und  $\alpha$ -Cateninbindungsregionen in ZO-1. Gezeigt ist die Bindung von GST-Fusionsproteinen von Occludin<sub>406-521</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> an Membranen, auf der Peptide aus der Hingeregion (ZO-1<sub>571-645</sub>) und der zweiten Hälfte der GUK-Domäne (ZO-1<sub>726-810</sub>) synthetisiert wurden. Die Detektion der Bindung erfolgte über die Chemolumineszenz eines mit HRP-gekoppeltem anti-GST-Antikörpers. Jeder Punkt der gezeigten Membranen enthält ein 20 AS langes Peptid, wobei die Sequenz von Punkt zu Punkt um je eine Aminosäure verschoben wurde (z. B. 1a: ZO-1<sub>571-590</sub>; 2a: ZO-1<sub>572-591</sub>). Dunkle Punkte zeigen eine Bindung an. Die GST-Konstrukte von Occludin und  $\alpha$ -Catenin banden dieselben ZO-1-Peptide aus CC1, H1 und H2, die schon im Modell als Bindungsbereich vorhergesagt wurden.  $\alpha$ -Catenin band im Gegensatz zu Occludin schwächer und nur an einen kürzeren Bereich der ZO-1-CC1-Region.

Um die unter Punkt 3.4.1. beschriebenen möglichen Probleme mit Cysteinen auszuschließen, wurden alle auf der Membran synthetisierten Peptide von ZO-1, die das Cystein C744

enthielten, auch mit Serin statt Cystein hergestellt. Die C=>S mutierten Peptide zeigten die gleichen Bindungsergebnisse wie die sequenzanalogen nativen Peptidpunkte in Abb. 3.25. Das zeigt, dass die Bindungsergebnisse nicht durch die Bildung von Disulfidbrücken beeinflusst sind.

**A:** Wildtypsequenzen der Hingeregion **B:** Simulation der Phosphorylierung



**C:**



**D:** Occludinbindung an Peptidpunkte 582-603

	WT	S609E	S610E
MW	1,8	1,3	1,2
SD	0,7	1,1	1,0
N	22	22	22
SEM	0,16	0,24	0,22

**E:** Einfluss verschiedener Mutationen auf die Occludinbindung an Peptide der ZO-1-Hingeregion

	MW	SD	SEM
3x S609=S	1,7	0,3	0,2
3x S609=pS	2,0	0,5	0,3
3x S609=E	1,0	0,0	0,0
3x S610=S	1,5	0,5	0,3
3x S610=pS	1,2	0,3	0,2
3x S610=E	0,7	0,3	0,2

**Abb. 3.26.** Bindung von GST-Occludin<sub>406-521</sub> an auf Membranen synthetisierte Peptide aus der Hingeregion von ZO-1 mit Mutationen, die eine Serinphosphorylierung simulieren. Die Detektion der Bindung erfolgte über die Chemolumineszenz eines mit HRP-gekoppeltem anti-GST-Antikörpers. Alle synthetisierten Punkte enthalten je ein Peptid mit einer Länge von 30 AS. Die Peptide sind jeweils mit der Nummer ihrer N-terminalen AS aus der Maus-ZO-1-Sequenz benannt. **A)** Peptide aus der Wildtypsequenz der ZO-1-Hingeregion. Beginnend mit dem Peptid ZO-1<sub>571-600</sub> ist in jedem weiteren Punkt die Sequenz um eine AS C-terminal verschoben. **B)** Analoge Peptidpunkte zu A jetzt mit Mutation S609E (schwarz beschriftete Punkte) bzw. S610E (grün beschriftete Punkte). Unterhalb der roten Linie ist links 9x das Peptid ZO-1<sub>595-624</sub> und rechts 9x das Peptid ZO-1<sub>596-625</sub> immobilisiert. Von links nach rechts wurden dabei erst 3x die Wildtypsequenz mit Serin (S), 3x eine Sequenz mit Phosphoserin (pS) und 3x eine Sequenz mit Glutamat (E) an den Positionen 609 bzw. 610 synthetisiert. **C)** Darstellung der die S=>E-Mutation von S609 und S610, sowie der flankierenden ZO-1-Sequenz. Dargestellt ist die von PSD-95 abgeleitete Sekundärstruktur (SS) mit H= $\alpha$ -Helix, B= $\beta$ -Strang, cc = Coiled-coil-Vorhersage von CC1. E zeigt die Position der jeweiligen S=>E-Mutation. **D)** Die Stärke der beobachteten Occludinbindungen an die verschiedenen Peptidpunkte wurde visuell mit einer Skala von 0-3 bewertet. Für die Peptidpunkte mit den N-terminalen AS 582-603, die bei allen Mutationen und dem Wildtyp eine Interaktion mit Occludin zeigen, wurden Mittelwerte gebildet. **E)** Statistische Auswertung der visuell bewerteten Occludinbindung an die Peptidpunkte unterhalb der roten Linie in B).

In der Literatur wird eine Serinphosphorylierung in der Hingeregion von ZO-1 beschrieben (Balda et al., 1996a). Die genaue Position wurde nicht identifiziert, aber nach den verwendeten Sequenzen muss es eines der Serine S609 bzw. S610 von Maus-ZO-1 sein. Diese Serine liegen im unter 3.4.2. identifizierten CC1-Interaktionsbereich von Occludin und  $\alpha$ -Catenin. Eine Phosphorylierung an dieser Position könnte also für die Wechselwirkung dieser Proteine mit ZO-1 eine regulatorische Bedeutung haben. Zum Simulieren der negativen Phosphorylierung wurden die entsprechenden Sequenzen mit Glutamat anstelle des Serins als je 30 AS lange Peptide auf einer Membran synthetisiert und die Bindung von GST-Occludin<sub>406-521</sub> mit Chemilumineszenz detektiert (Abb. 3.26). Sowohl die S609E als auch die S610E Mutation bewirkte dabei eine Verringerung der Occludinbindung (Abb. 3.26.D). Wurde direkt Phosphoserin für die Mutation verwendet, gab es keine signifikanten Änderungen. Mit Phosphoserin gab es jedoch noch keine Erfahrungen in der Arbeitsgruppe, wo die Peptidmembranen synthetisiert wurden (Michael Portwich, AG Scheider-Mergner, Charité Berlin). Deshalb könnte sich das Phosphat des Phosphoserin möglicherweise beim Experimentieren (Waschen, Regenerieren der Peptidmembranen) abgelöst haben, sodass nur die Wildtypsequenz auf der Membran verblieb.

#### **3.4.4. Zusammenfassung der Peptidbindungsergebnisse**

Die Peptidmembranmessungen bestätigen die bisherigen Annahmen. Die basischen ZO-1-Peptide CC1 und H2 binden an die sauren Ha/Hb und CCa/CCb-Bereiche von Occludin, sowie an saure Bereiche von  $\alpha$ -Catenin. Das H1-Peptid bindet dagegen auch z.T. basische Peptidpunkte aus  $\alpha$ -Catenin. Im umgekehrten Bindungsansatz wurden für Occludin und  $\alpha$ -Catenin nahezu identische Interaktionsbereiche in ZO-1 bei den CC1, H1/H2-Regionen gefunden. Dies zeigt klar, dass diese beiden Proteine in der Zelle um dieselbe Bindungsstelle an ZO-1 konkurrieren. Untersuchungen zur beschriebenen Phosphorylierungsstelle in der CC1 zeigten durch das Einbringen negativer Ladungen (E oder pS statt S) eine abnehmende Bindung an Occludin.

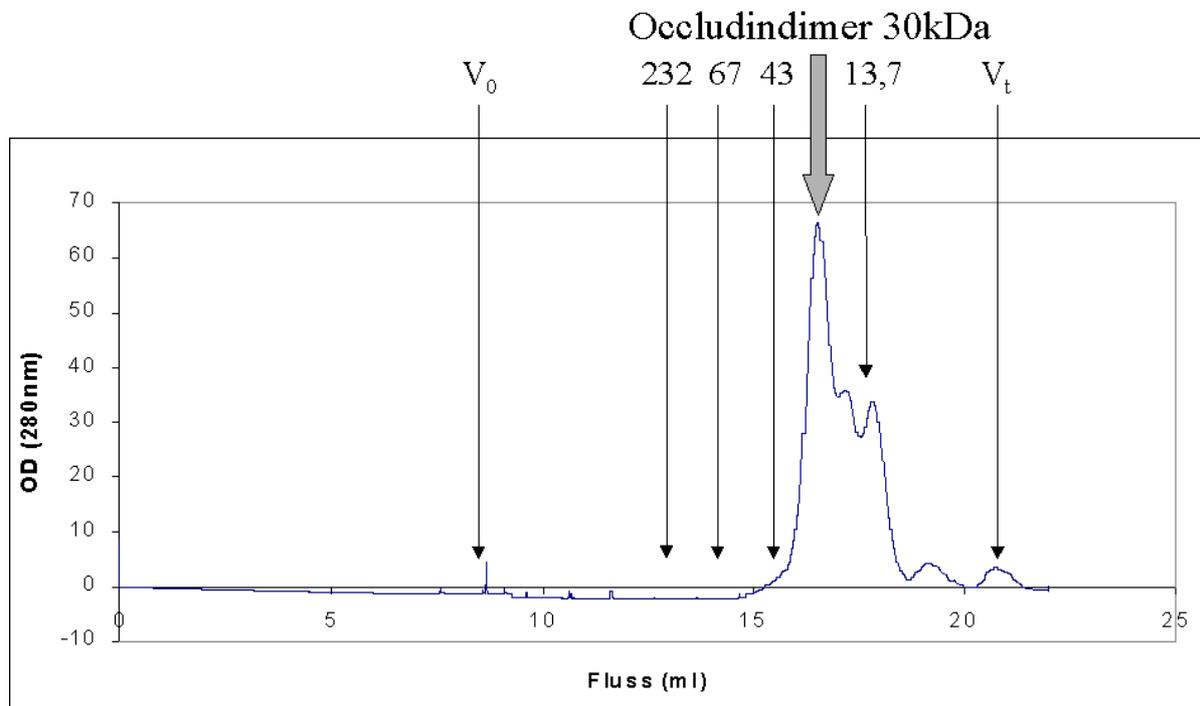
### 3.5. Hinweis auf Dimerisierung von Occludin durch biophysikalische Untersuchungen

Zur näheren Charakterisierung von Occludin wurde das Konstrukt Maus-Occludin<sub>406-521</sub> mit verschiedenen biophysikalischen Methoden untersucht. Dieses Konstrukt wurde verwendet, da es alle im Modell vorhergesagten Strukturelemente enthält und laut Literatur eine proteolytisch stabile Struktur bildet (Peng et al., 2003). Das für die Affinitätsreinigung nötige MBP wurde mit der Protease Xa abgespalten (Abschnitt 2.1.3). Das Konstrukt Occludin<sub>406-521</sub> trug durch die Verwendung der Klonierungsstelle BamHI am N-Terminus nach der Xa-Spaltung noch sechs zusätzliche AS (ISEFGS). Sie wurden durch die verbliebenen Sequenzen aus dem multiplen Klonierungsbereich des benutzten pMal-C2x-Vektors gebildet. Ein ebenfalls erzeugtes Konstrukt ohne diese sechs AS zeigte eine sehr schlechte Effizienz der Xa-Spaltung. Das könnte darauf hindeuten, dass der durch die sechs AS bewirkte größere Abstand von der Xa-Spaltstelle und der gefalteten Occludindomäne für den guten sterischen Zugang der Protease Xa nötig ist. Da die folgenden Untersuchungen relativ viel von dem MBP-freien Occludin erforderten, wurde der besseren Reinigungseffizienz wegen das Konstrukt mit den zusätzlichen sechs AS und einer berechneten Monomermasse von 14587 Da verwendet. Bei Versuchen mit MBP-ZO-1-Konstrukten wurde leider das ZO-1 durch die Protease Xa ebenfalls angegriffen, so dass keine biophysikalischen Versuche mit dem MBP-freien ZO-1 unternommen werden konnten.

#### 3.5.1. Analytische Größenausschlusschromatographie von Occludin

Zur näheren Charakterisierung wurde MBP-freies Occludin<sub>406-521</sub> über eine Größenausschlusschromatographie analysiert. Im Vergleich mit verschiedenen Markerproteinen zeigte sich ein Hauptpeak bei etwa 30 kDa, was einem Dimer entspricht (Monomermasse berechnet = 14587 Da). Es gab jedoch noch zwei überlappende kleinere Peaks (Abb. 3.27). Nach der Lage des 13,7 kDa Markerproteins ist der linke höchstwahrscheinlich der Monomerpeak, während der rechte möglicherweise ein kleineres Degradationsprodukt darstellt. Auf SDS-PAGE-Gelen waren von dem verwendeten Occludinkonstrukt jedoch keine Abbauprodukte zu sehen. Deshalb könnte es auch sein, dass unter den benutzten Pufferbedingungen die Occludinmoleküle in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, die ein differierendes Laufverhalten auf der Säule zeigen. Der Versuch einer Abtrennung des MBP nach der Xa-Spaltung durch Größenausschlusschromatographie vom Occludin<sub>406-521</sub> scheiterte. Die benutzte Säule (*Superdex 75 prep grade* HR 16/60 trennt im Bereich kleinerer Proteine (3.000 bis 70.000 Da) gut auf. Aufgrund der berechneten Molekulargewichte (MBP = 43 kDa Occludin<sub>406-521</sub> = 15 kDa) sollte sich das MBP leicht vom Occludin trennen lassen. Dies ist ebenfalls ein Hinweis,

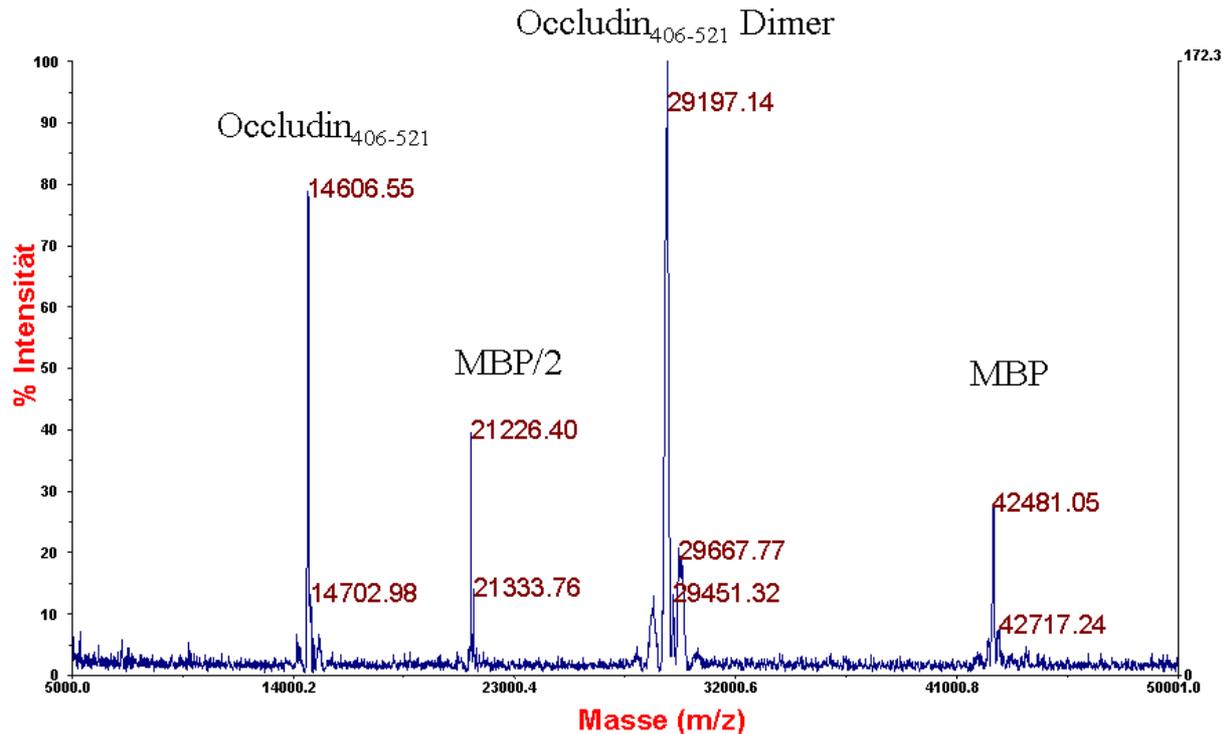
dass Occludin<sub>406-521</sub> hauptsächlich als Dimer (~30 kDa) in der Säule vorliegt und sich deshalb kaum vom MBP (43 kDa) trennen ließ (Abb. 2.1).



**Abb. 3.27.** Größenausschlusschromatographie von 0,5 mg/ml MBP-freiem Occludin<sub>406-521</sub> (Monomermasse berechnet = 14587 Da) mit einer mit *Superdex 200* Säule. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Absorption zur Flussmenge (bei 0,5 ml/min). Durch die schwarzen Pfeile wurde die Lage des Ausschlussvolumens  $V_0$  (gemessen mit *Dextran Blue 2000*) und des Totvolumens  $V_t$  (Acetonpeak), sowie verschiedener Markerproteine [Catalase (232 kDa), Albumin (67 kDa) Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuklease (13,7 kDa)] dargestellt.

### 3.5.2. Massenspektroskopie von Occludin

Bei der Analyse von Occludin<sub>406-521</sub> mit MALDI zeigten sich ebenfalls Hinweise auf Dimerisierung (Abb. 3.28). Mittels der Massenspektroskopie wurden auch in Proben, wo nach Coomassiefärbung eines SDS-Gels nur noch reines Occludin<sub>406-521</sub> enthalten war, noch Spuren von MBP entdeckt. Die Tatsache, dass Occludindimere in der Massenspektroskopie sichtbar sind, deutet auf eine sehr feste Bindung hin. Das unter den Bedingungen der Massenspektroskopie beobachtete Occludinmonomer könnte z.T. oder gänzlich auch ein Dimer mit doppelter Ladung sein. Dies kann das Gerät nicht unterscheiden, da nur der Quotient aus Masse und Ladung ( $m/z$ ) detektiert wird.

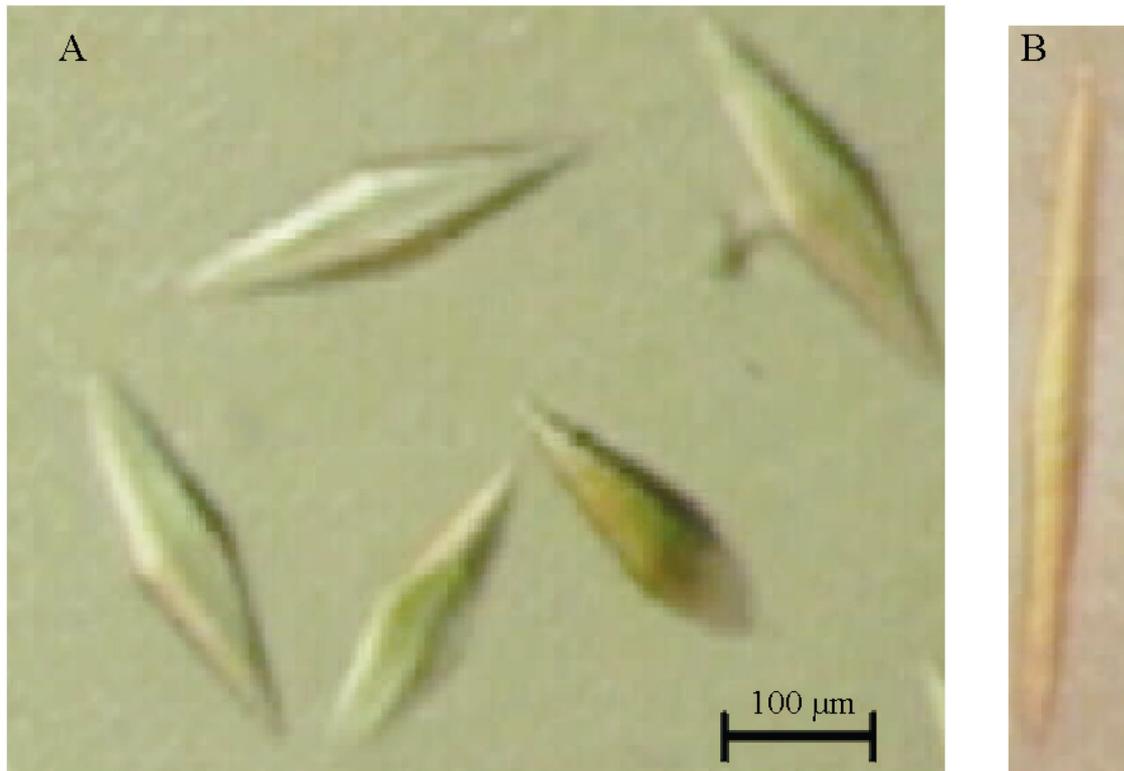


**Abb. 3.28.** MALDI-MS von MBP-freiem (laut Coomassiefärbung) Occludin<sub>406-521</sub>. Laut SDS-Gel war kein MBP mehr sichtbar, aber der Peak bei 42481,05 Da passt gut zur errechneten Masse des MBP aus unserem Konstrukt (42482 Da). Der Peak bei 21226,40 Da entspricht höchstwahrscheinlich dem doppelt geladenen MBP-Molekül, wodurch sich da m/z Verhältnis halbiert (auf theoretisch 21241 Da). Die anderen beiden markanten Peaks passen zum Occludin<sub>406-521</sub>-Monomer (14606,55 Da gemessen; theoretisch 14587,11 Da) und Occludin<sub>406-521</sub>-Dimer (29197,14 Da gemessen; theoretisch 29174,22 Da). Unterhalb eines m/z-Verhältnisses von 5000 Da gab es viele Peaks, die wahrscheinlich von verschiedenen Degradationsprodukten stammten.

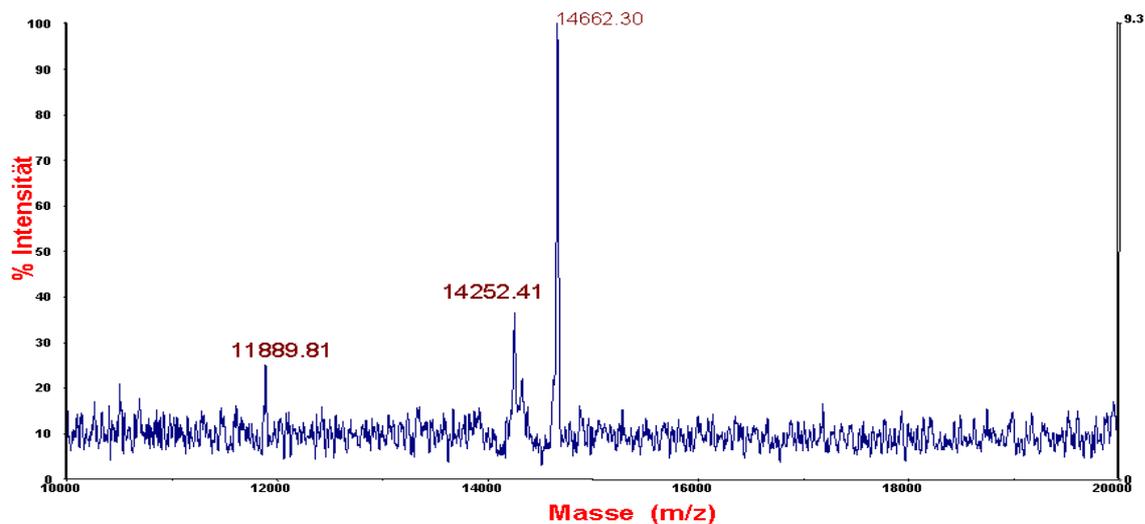
### 3.5.3. Kristallisation von Occludin

Um nicht nur Homologiemodelle, sondern auch experimentelle Strukturdaten zu erhalten, wurde versucht, Occludin<sub>406-521</sub> zu kristallisieren. Nach dem Testen mehrerer hundert verschiedener Pufferbedingungen mit der *hanging drop*-Methode zeigten sich unter dem Binokular in einer Lösung von 20-30% Methylpentandiol (MPD) und 17-27,5% Ethanol Kristalle (Abb. 3.29). Bei der Röntgenkristallographie werden kohärente Röntgenstrahlen durch ein Proteinkristall gestrahlt und das entstehende Beugungsmuster analysiert. Zum Errechnen der im Kristall vorliegenden Elektronendichteverteilung (und damit der Atomkoordinaten) muss man auch wissen, in welcher Weise die Phase der Röntgenstrahlung vom Kristall verändert wurde. Dies ist aber nicht aus dem Beugungsmuster ablesbar. Mit Hilfe eines weiteren Datensatzes aus einem durch Schwermetalleinschlüsse modifizierten Proteinkristall, wo die Phase definiert verschoben ist, kann man dieses Phasenproblem lösen und auf die Phaseninformation rückschließen. Dazu wurde Occludin<sub>406-521</sub> auch als Selenomethioninderivat in metauxotrophen Zellen hergestellt. In der entsprechenden

Occludinsequenz von Maus gibt es zwei Methionine an den Positionen 474 und 512. Der Einbau an Selenomethionin anstelle von Methionin wurde mit MALDI-Massenspektroskopie abgeschätzt (Abb. 3.30).



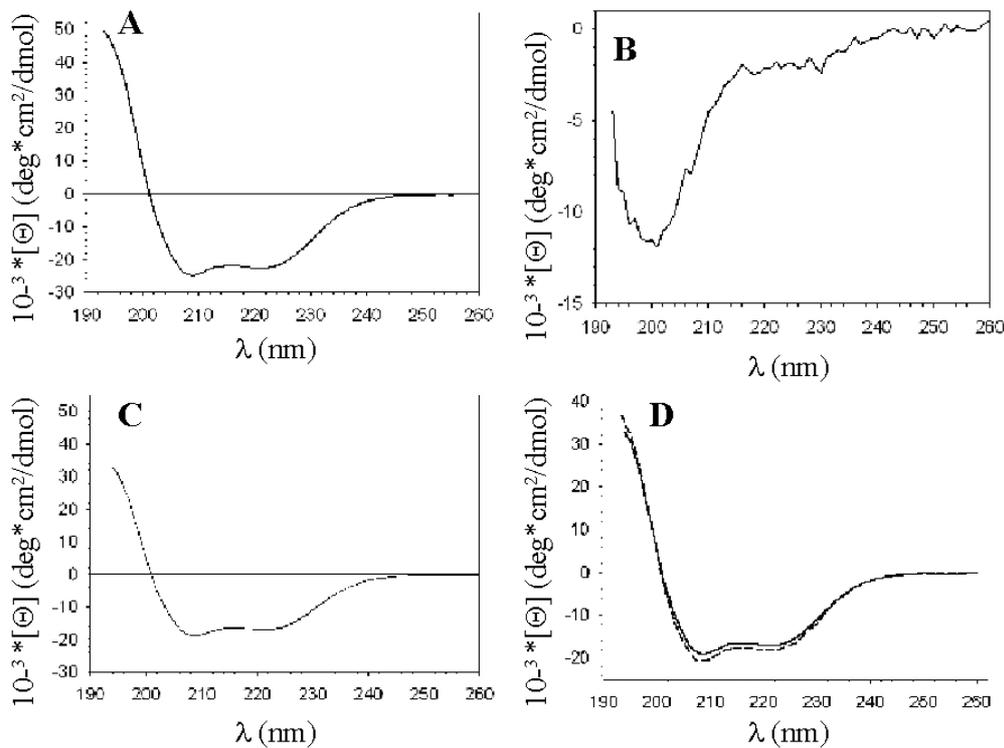
**Abb. 3.29.** Proteinkristalle von Occludin<sub>406-521</sub>. Es traten zwei verschiedene Formen auf. Einerseits **(A)** Kristalle in Form einer tetragonalen Bipyramide mit einer Länge von 0,05-0,2 mm, sowie **(B)** als langgestreckte Bipyramide mit einer Länge von 0,1-0,7 mm.



**Abb. 3.30.** Massenspektroskopische Analyse des Selenomethioninderivats von Occludin<sub>406-521</sub>. Die entsprechende Maus-Sequenz enthält zwei Methionine an den Positionen 474 und 512, bei denen das Schwefelatom (32,06 Da) durch Selen (78,96 Da) ersetzt wurde. Dadurch steigt rechnerisch das Molekulargewicht des Gesamtproteins von 14587 Da um 93,8 Da auf 14680,8 Da. Der hier beobachtete Peak von 14662,30 Da stimmt innerhalb der Messgrenzen damit überein. Die zwei kleineren Peaks sind wahrscheinlich Abbauprodukte.

### 3.5.4. Circulardichroismus-Spektroskopie

Mit dieser Methode wurde die Sekundärstruktur von Occludin<sub>406-521</sub> bestimmt (Johnson, 1990). Es zeigte sich eine typische  $\alpha$ -helikale Struktur mit intensiven negativen Banden bei 222 und 208 nm (Abb. 3.31.A). Der Anteil der  $\alpha$ -Helikalizität wurde (Chen et al., 1972) mit 66% ermittelt, was gut mit der unter Punkt 3.1.1. erhaltenen Sekundärstrukturvorhersage übereinstimmt. Die negative Bande bei 200 nm des H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> (Abb. 3.31.B) wies auf ein Zufallsknäuel hin. In diesem Peptid lagen, in Puffer SP5 (10 mM Tris; pH 7,5; 20 mM NaCl), keine definierten Sekundärstrukturelemente vor.



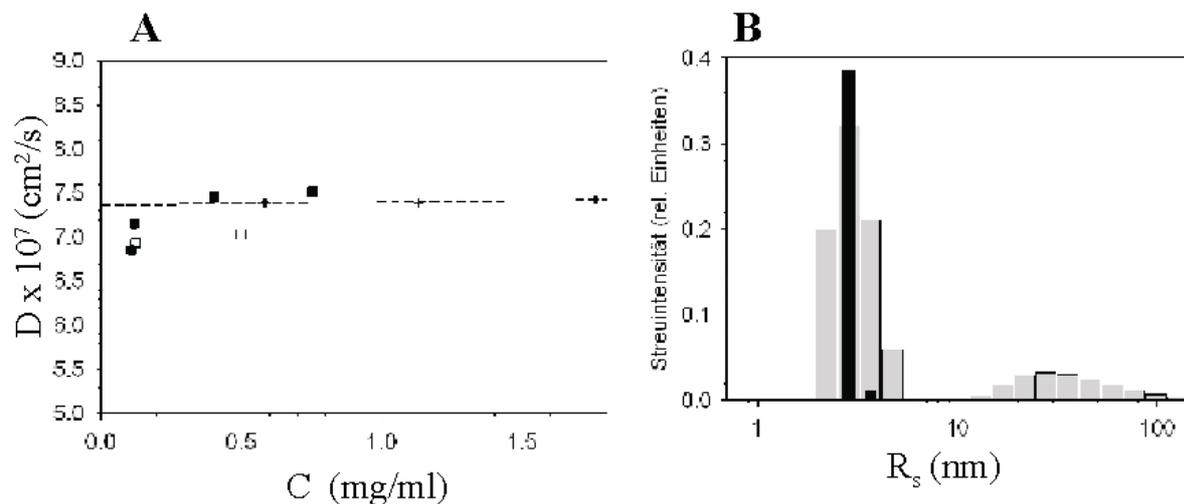
**Abb. 3.31.** CD-Spektroskopie von Occludin<sub>406-521</sub> und dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> in SP5 bei 20 °C, d=0,1 cm. Dargestellt ist die molare Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge. **A)** CD-Spektrum von Occludin<sub>406-521</sub> (0,162 mg/ml). **B)** CD-Spektrum des H2-Peptids ZO-1<sub>745-772</sub> (0,041 mg/ml) **C)** CD-Spektrum eines 1:1-Komplexes der Proteine aus A und B nach 3 Tagen. **D)** Vergleich des gemessenen Komplex- (-) und des berechneten Summenspektrums (-- von Occludin<sub>406-521</sub> und dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub>.

Nach einer Mischung von Occludin<sub>406-521</sub> und dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> im Verhältnis 1:1 (und auch 1:10) kam es nach wenigen Sekunden zu einer sichtbaren Trübung der Lösung, was auf eine Interaktion hindeutet. Die Trübung verhinderte eine CD-Messung. Nach 2-3 Tagen klarte die Lösung jedoch wieder vollständig auf und konnte vermessen werden (Abb. 2.29.C). Das Spektrum zeigte wie das Einzelspektrum von Occludin<sub>406-521</sub> (Abb. 3.29.A) eine deutliche  $\alpha$ -helikale Struktur, wies jedoch eine Verschiebung zu positiveren spezifischen Elliptizitäten ( $\theta$ ) auf. Das Komplexspektrum (Abb. 3.29.C) bestand aus den Komponenten Occludin<sub>406-521</sub>

und ZO-1<sub>745-772</sub>, wobei nicht gesagt werden konnte, ob sie einzeln oder in einem Komplex vorlagen und ob sich ihre Strukturen nach Komplexbildung verändert hatten. Daher wurde anhand der Einzelspektren von Occludin<sub>406-521</sub> und ZO-1<sub>745-772</sub> ein theoretisches Summenspektrum (--) dieser beiden einzelnen Komponenten berechnet. Bei der Berechnung der spezifischen Elliptizität wurden die Konzentrationsänderungen bei Zugabe von ZO-1<sub>745-772</sub> zu Occludin<sub>406-521</sub> berücksichtigt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede vom Summen- zum Komplexspektrum (Abb. 3.29.D). Daher ist zu vermuten, dass die Komponenten Occludin<sub>406-521</sub> und ZO-1<sub>745-772</sub> nicht mehr als Komplex, sondern einzeln in der Lösung vorlagen und die gleiche Struktur wie vor der Komplexbildung zeigten. Um diese Vermutungen zu bestätigen, müssten weitere Vergleichsmessungen vorgenommen werden.

### 3.5.5. Dynamische und statische Lichtstreuung zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Occludin

Durch diese Messungen sollten der Oligomerisierungsgrad vom Occludin<sub>406-521</sub>, MBP-Occludin<sub>406-521</sub>, MBP und dem 1:1-Komplex vom Occludin<sub>406-521</sub> mit dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> ermittelt werden. Durch die DLS-Messungen konnte der Diffusionskoeffizient und aus ihm der Stokes-Radius ( $R_s$ ) und die Molmassen ( $M$ ) aus der SLS-Messung bestimmt werden (Abb. 3.32; Tabelle 3.9).



**Abb. 3.32.** Messungen zum Oligomerisierungsgrad durch DLS; **A)** Dargestellt ist die Abhängigkeit vom Diffusionskoeffizient zur Proteinkonzentration. In zwei verschiedenen Messungen (1.M. = ■; 2.M. = □) wurde Occludin<sub>406-521</sub>, sowie der 1:1-Komplex von Occludin<sub>406-521</sub> mit dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> nach 3 Tagen (●) vermessen. Zum Vergleich diente reines MBP (+). **B)** Dargestellt ist die Abhängigkeit der Streuintensität zur Verteilung der Stokes-Radien ( $R_s$ ) von MBP (schwarz) und Occludin<sub>406-521</sub> (grau).

Zur besseren Anschauung sind die Messdaten aus Abb. 3.32 noch einmal in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Das MBP-Protein verhält sich in Abb. 3.32.A wie ein ideal monomeres Protein. Drei unabhängige Messungen (DLS) bei verschiedenen Konzentrationen ergaben stets den gleichen Diffusionskoeffizienten (D). Der kleine Stokes-Radius entspricht ebenso dem eines Monomers und zeigt in Abb. 3.32.B einen scharfen symmetrischen Peak (schwarz). Das ermittelte Molekulargewicht (SLS) von 42,7 kDa stimmt ziemlich genau mit dem aus den AS berechneten Molekulargewicht von 42482 Da überein.

**Tabelle 3.9:** Ergebnisse der Lichtstreuungsexperimente: Molmassen (M), Diffusionskoeffizienten (D), Stokes-Radius ( $R_S$ ). Alle Messungen wurden bei RT und in SP5 durchgeführt. Die Daten von Occludin<sub>406-521</sub> und MBP beziehen sich jeweils auf den Hauptpeak (s. Abb. 3.32.B). In Klammer sind Werte angegeben, bei denen aus verschiedenen Gründen die gemessenen Werte von den erwarteten abweichen. Näheres dazu im Text.

Protein	M (kDa)	$D \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	$R_S$ (nm)	$M_{\text{Monomer}}$ (kDa)	$R_{S\text{berechnet}}$ (nm) für Monomer
Occludin <sub>406-521</sub> (1.Messung)	23 ± 5	7,49 ± 0,20	2,86 ± 0,07	14,6	1,92
Occludin <sub>406-521</sub> (2.Messung)	27,8 ± 6,0	6,96 ± 0,20	3,08 ± 0,07	14,6	1,92
ZO-1 <sub>745-772</sub>	(1440)	(22,3 ± 5,0)	(0,96 ± 0,05)	3,7	1,16
1:1-Komplex (sofort nach Mischung)	-	(0,027 ± 0,001)	799 ± 30	-	-
1:1-Komplex (3 Tage nach Mischung)	28,7 ± 8,0	7,00 ± 0,50	3,06 ± 0,20	-	-
MBP- Occludin <sub>406-521</sub>	(36)	6,67 ± 0,20	3,21 ± 0,05	57,1	3,16
MBP	42,7 ± 2,0	7,51 ± 0,10	2,86 ± 0,03	42,5	2,84

Die Messungen in der DLS gehen von globulären Proteinen aus. Für eine ideale Kugel gilt die Beziehung:

$$R_S = 0,0557 M^{0,369}$$

$R_S$  wird in nm und M in Da angegeben (Skalengesetze). Zum Vergleich mit den gemessenen Stokes-Radien wurden mit Hilfe dieser Beziehung die einer idealen Kugel entsprechenden Radien aus den Molmassen berechnet (Tabelle 3.9. letzte Spalte). Bei MBP stimmen der gemessene und der für eine Kugel errechnete Radius nahezu perfekt überein. Occludin<sub>406-521</sub> (Abb. 3.32.A) wurde von zwei Aufreinigungen und bei 2 verschiedenen Konzentrationen (0,16-0,75 mg/ml) vermessen. Die gemessenen Diffusionskoeffizienten wichen dabei etwas voneinander ab. Das Molekulargewicht (SLS) von rund 30 kDa (Monomer 15 kDa) wies auf ein Dimer hin. Die Darstellung der Streuintensität im Verhältnis zum Stokes-Radius (der Abb. 3.32.B) zeigte eine breite Verteilung (2-6 nm mit dem Maximum bei 3 nm), was auf das

Vorhandensein einer Population verschiedener Oligomere (Monomer, Dimer, Trimer) von Occludin<sub>406-521</sub> hindeutet. Der im Maximum gemessene Stokes-Radius (~3 nm) spricht im Vergleich mit dem berechneten Stokes-Radius eines Monomers (1,92 nm) für das Vorliegen eines Dimers von Occludin<sub>406-521</sub>. Im Bereich von über 10-100 nm zeigte sich ein geringer Anteil von Aggregationen mit niedriger Streuintensität. Occludin<sub>406-521</sub> lag daher vorrangig als Dimer vor und wies einen kleinen Anteil an Aggregaten auf.

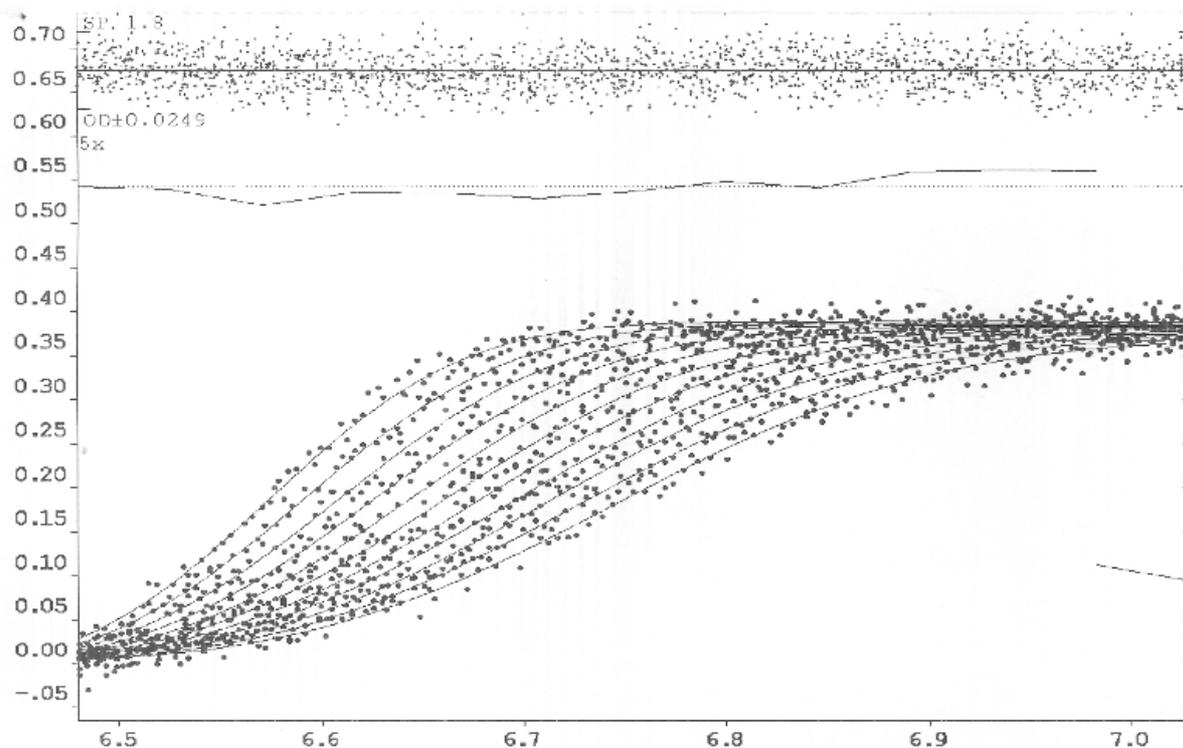
Der 1:1-Komplex von Occludin<sub>406-521</sub> mit dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> zeigte sofort nach Mischung (Tab.3.9) große Stokes-Radien und kleine Diffusionskoeffizienten. Das Molekulargewicht war aufgrund der hohen Aggregation und sichtbaren Trübung der Lösung nicht bestimmbar. Nach drei Tagen (nach Aufklaren der Lösung) wurde der Komplex aus Occludin<sub>406-521</sub> und ZO-1<sub>745-772</sub> zweimal bei gleicher Konzentration vermessen. Auffällig war, dass die Molmasse, der Diffusionskoeffizient und der Stokes-Radius eine große Ähnlichkeit mit den gemessenen Werten des Occludin<sub>406-521</sub> zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse und der CD-Untersuchungen (Abschnitt 3.5.4) kann man vermuten, dass Occludin<sub>406-521</sub> und das H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> erst kurzfristige Aggregate bildeten, aber nach drei Tagen wieder einzeln in ihrer Ausgangsstruktur in der Lösung vorlagen. Die Messungen des H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> wurden bei sehr hohen Konzentration von 13,5 mg/ml durchgeführt. Die Werte für D und R<sub>S</sub> können dadurch beeinflusst sein. Die gemessenen Werte für Stokes-Radius und Molekulargewicht sprechen für ein Monomer des H2-Peptids (Tabelle 3.9).

Bei der Berechnung des Molekulargewichts wurde die Gesamtkonzentration (2 mg/ml) des Fusionsproteins MBP-Occludin verwendet. Die tatsächliche Konzentration des Monomeranteils war offensichtlich geringer, da ein erheblicher Teil des Proteins in Form von Aggregaten vorlag. Deshalb ist die so erhaltene Molmasse mit 36 kDa kleiner als der reale Wert von 57 kDa. Eine eindeutige Trennung in Konzentration der Monomere und Konzentration der Aggregate anhand der Radienverteilung (analog zu Abb. 3.32.B) war bei MBP-Occludin<sub>406-521</sub> nicht möglich. Die Messungen (M, R<sub>S</sub>) sprechen jedoch für ein überwiegend als Monomer vorliegendes Fusionsprotein. Des Weiteren wurde das MBP-Occludin<sub>406-521</sub> und das reine MBP mit dem H2-Peptid ZO-1<sub>745-772</sub> jeweils 1:1 vermessen (Daten nicht dargestellt). MBP-Occludin<sub>406-521</sub> zeigte bei Zugabe von ZO-1<sub>745-772</sub> Trübung der Lösung mit großen Stokes-Radien, die nach drei Tagen wieder verschwand. Pures MBP hingegen führte bei Zugabe von ZO-1<sub>745-772</sub> zu keinem dieser Effekte. Daher ist auf eine Interaktion der Occludinsequenz mit dem H2-Peptid zu schließen.

### 3.5.6. Analytische Ultrazentrifugation von Occludin

In den Geschwindigkeitsläufen konnten Svedbergkoeffizienten von  $1,5-1,6 \cdot 10^{-13}$  s bei Proteinkonzentrationen von  $0,5-1,5$  mg/ml (Behlke und Ristau, 1997) aus den Wanderungsgeschwindigkeiten der Sedimentationsfront (Abb. 3.15.) ermittelt werden.

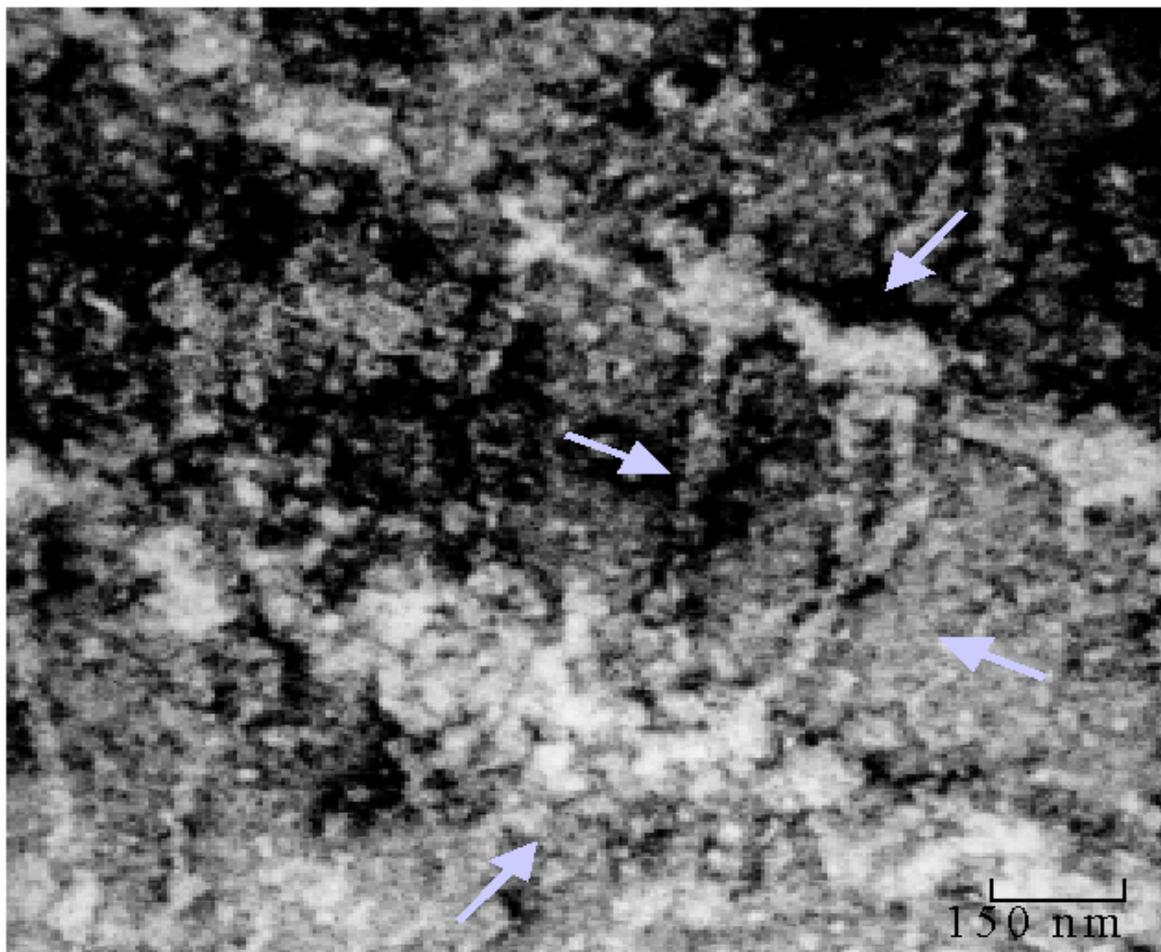
Die erhaltenen mittleren Molekulargewichte (von 14966 und 19438 Da) bei den verschiedenen Ladungskonzentrationen ( $0,5-1,5$  mg/ml) sprachen für ein Auftreten von Assoziaten, da sie größer waren als das reine Monomer (14587 Da). Sie sollten in Gleichgewichtsläufen genauer ermittelt werden. In den Gleichgewichtsläufen gestaltete sich jedoch die exakte Bestimmung der Massen schwierig, da mehrere Oligomerisierungszustände (Monomer/ Dimer/ Trimer), sowie ein unbestimmter Anteil an Aggregaten vorlagen. Der Anteil der verschiedenen Zustände ließ sich nicht eindeutig bestimmen. Durch das Vorhandensein dieser unterschiedlichen Oligomerisierungszustände (einschließlich der Aggregate) konnten die erhaltenen Rohdaten der Gleichgewichtsläufe nicht ausgewertet werden. Insgesamt bestätigen diese Experimente, dass das verwendete Occludinkonstrukt Occludin<sub>406-521</sub> fähig ist zu oligomerisieren, auch wenn die genaue Stöchiometrie nicht ermittelt werden konnte.



**Abb. 3.33.** Analytische Ultrazentrifugation von  $0,5$  mg/ml Occludin<sub>406-521</sub> mit zeitabhängiger Bewegung der Sedimentationsfront im Geschwindigkeitslauf. Dargestellt ist die Absorption bei  $280$  nm im Verhältnis zum Radius (in cm ausgehend von der Zentrifugenachse).

### 3.5.7. Elektronenmikroskopie von Occludin

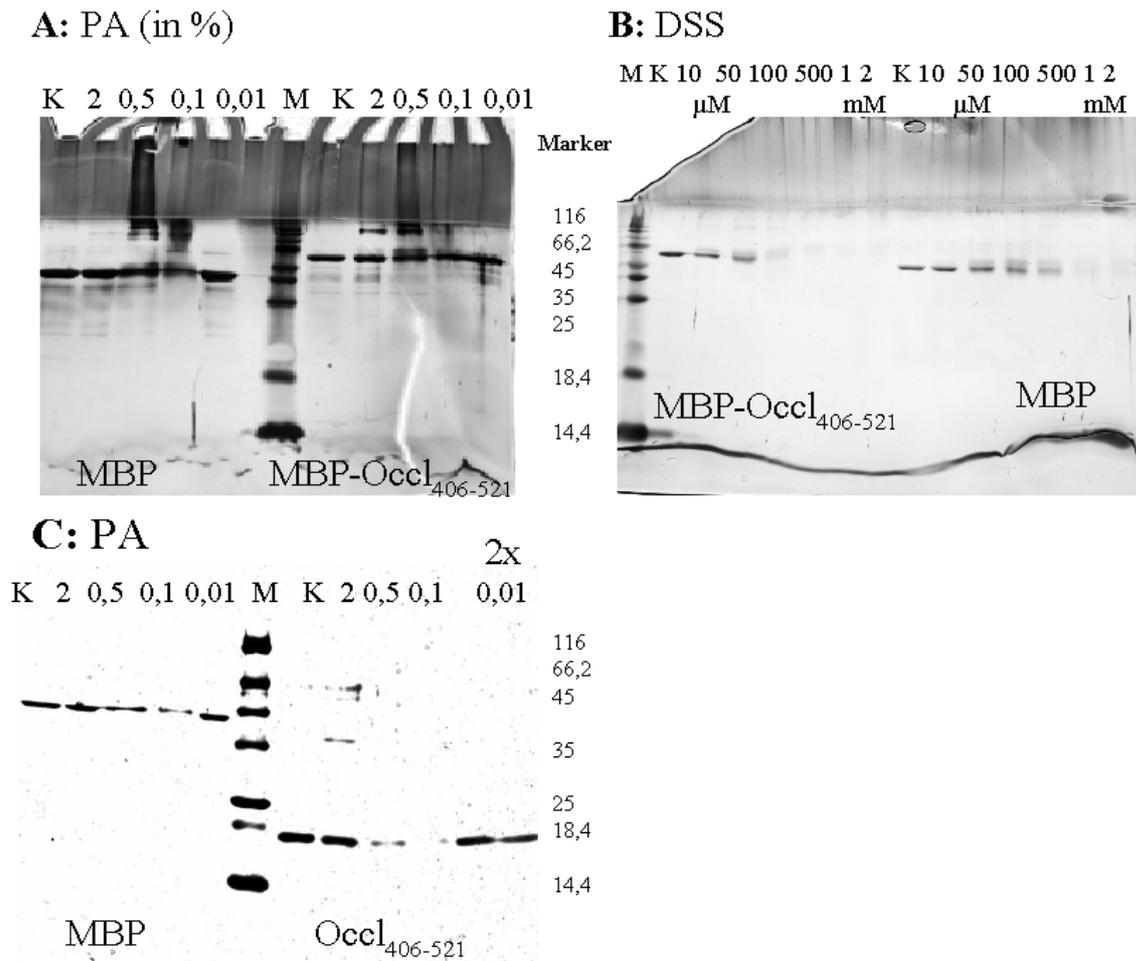
Mittels der Elektronenmikroskopie sollten die Oligomerisierungszustände von Occludin<sub>406-521</sub> besonders die Form der hochmolekularen Aggregate besser verstanden werden. Dazu wurde eine Proteinprobe mit einer Konzentration von 1 mg/ml benutzt (Abb. 3.34). In der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind eine Vielzahl von fibrillären Strängen zu erkennen. Zwei dickere Stränge (50-100 nm breit), die parallel zueinander verliefen, sind viel zu groß, um aus einzelnen Occludin<sub>406-521</sub>-Dimeren (~3 nm nach den DLS Messungen in Tabelle 3.9) zu bestehen. Es könnte sich aber um die in Abb. 3.32 beobachteten Aggregate mit Stokes-Radien von 10-100 nm handeln, die sich zu längeren fibrillären Strukturen zusammengelagert haben. Die beiden dicken Fibrillen waren durch im rechten Winkel abstehende dünnere Stränge verbunden. Diese würden möglicherweise von der Größe her zu den erwarteten Occludin-Dimeren passen. Um Artefakte auszuschließen, müssen diese Aufnahmen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen von Occludin<sub>406-521</sub> wiederholt und bestätigt werden.



**Abb. 3.34.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Occludin<sub>406-521</sub> (1 mg/ml) mit dem Kontrastmittel Uranylacetat. Fibrilläre Stränge sind durch Pfeile hervorgehoben. Der Balken ist 150 nm groß.

### 3.5.8. Quervernetzung von Occludin

Um weitere Hinweise auf die räumlichen Verhältnisse im Occludindimer zu erhalten, wurden *Crosslinking*-Versuche (Vernetzungsstudien) durchgeführt. Als Chemikalien wurden dabei Paraformaldehyd (PA) und Disuccimidylsuberat (DSS) eingesetzt, die jeweils Proteine über freie Lysine chemisch verknüpfen. Es wurden die Proteine Occludin<sub>406-521</sub>, MBP-Occludin<sub>406-521</sub> und zur Kontrolle das reine MBP untersucht.



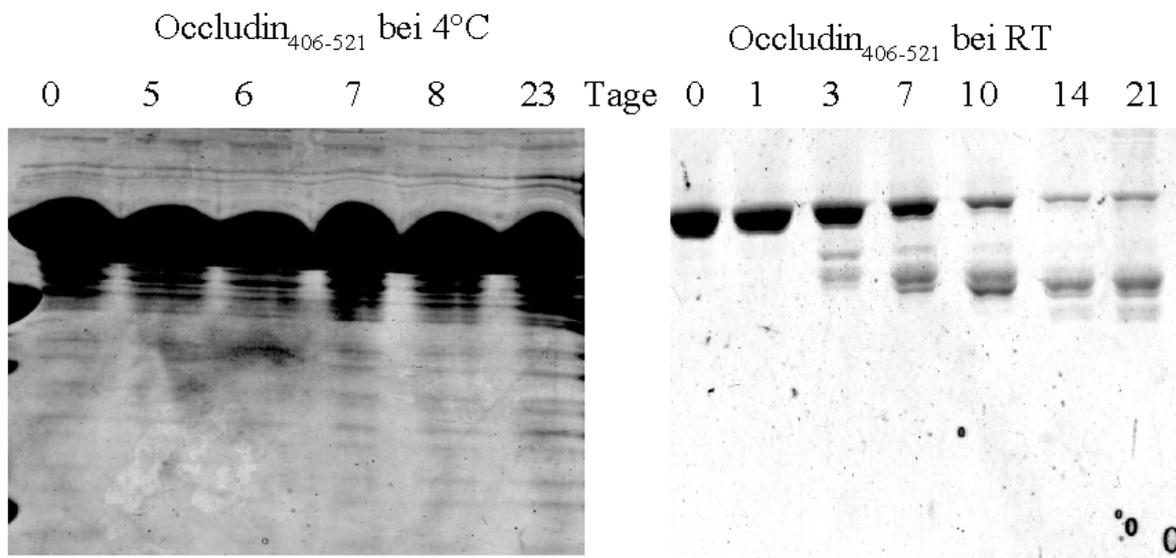
**Abb. 3.35.** Chemische Vernetzung von Occludin<sub>406-521</sub>, MBP-Occludin<sub>406-521</sub> und MBP mit Paraformaldehyd (PA) und Disuccimidylsuberat (DSS). K = Kontrolle ohne Vernetzer, M = Molekulargewichtsmarker in kDa; **A)** Vernetzung mit PA, Silberfärbung (Nachweisgrenze 1-10 ng Protein/mm<sup>2</sup> Gel); **B)** Vernetzung mit DSS, Silberfärbung; **C)** Vernetzung mit PA, Coomassie-G250-Färbung (Nachweisgrenze 10-20 ng Protein/mm<sup>2</sup>).

Das Vernetzungsreagenz PA (Spacerlänge 1,5 Å) vernetzte zwar bei Konzentrationen von 0,1-0,5% jedoch unspezifisch sowohl MBP-Occludin<sub>406-521</sub> als auch MBP (Abb. 3.35.A). Bei Verwendung von DSS (Spacerlänge 11,4 Å) war für diese beiden Proteine keine spezifische Interaktion erkennbar. Bei Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  DSS waren zwar die monomeren Banden des Proteine nicht mehr vorhanden, aber es waren keine vernetzten Banden bei der

doppelten Masse zu erkennen. Möglicherweise bildeten sich hier so große Komplexe, dass sie schon im Sammelgel zurückgehalten wurden und so nicht auf dem Gel erscheinen (Abb. 3.35.B). Bei 2 mM DSS mit MBP war eine Bande  $> 116$  kDa zu erkennen. Bei den bisherigen Experimenten konnte nicht eindeutig bestimmt werden, ob die kovalente Kopplung nur im MBP oder auch im Occludin stattfand. Deshalb wurde der Effekt von PA auf MBP und das MBP-freie Occludin<sub>406-521</sub> verglichen (Abb. 3.35.C). Einer Konzentration von 2% PA bewirkte eine Vernetzung von Occludin<sub>406-521</sub> in Höhe eines Dimers ( $\sim 38$  kDa) und Tetramers ( $\sim 60$  kDa). Das pure MBP weist schon bei 0,1% PA eine schwache Bande auf (Abb. 3.35 A). Occludin<sub>406-521</sub> wie auch MBP zeigten beide eine Vernetzung mit PA. Für genauere Studien müssten alle Ergebnisse auf Gelen mit Silberfärbung wiederholt und optimiert werden, um möglichst hohe Empfindlichkeiten zu erreichen.

### 3.5.9. Temperaturstabilität von Occludin<sub>406-521</sub>

Bei 4 °C war auch nach 23 Tagen kein nennenswerter Zerfall zu beobachten, während bei RT schon am dritten Tag deutliche Degradationsprodukte zu sehen waren und nach 21 Tagen das Originalprotein fast völlig zerfallen war (Abb. 3.36).



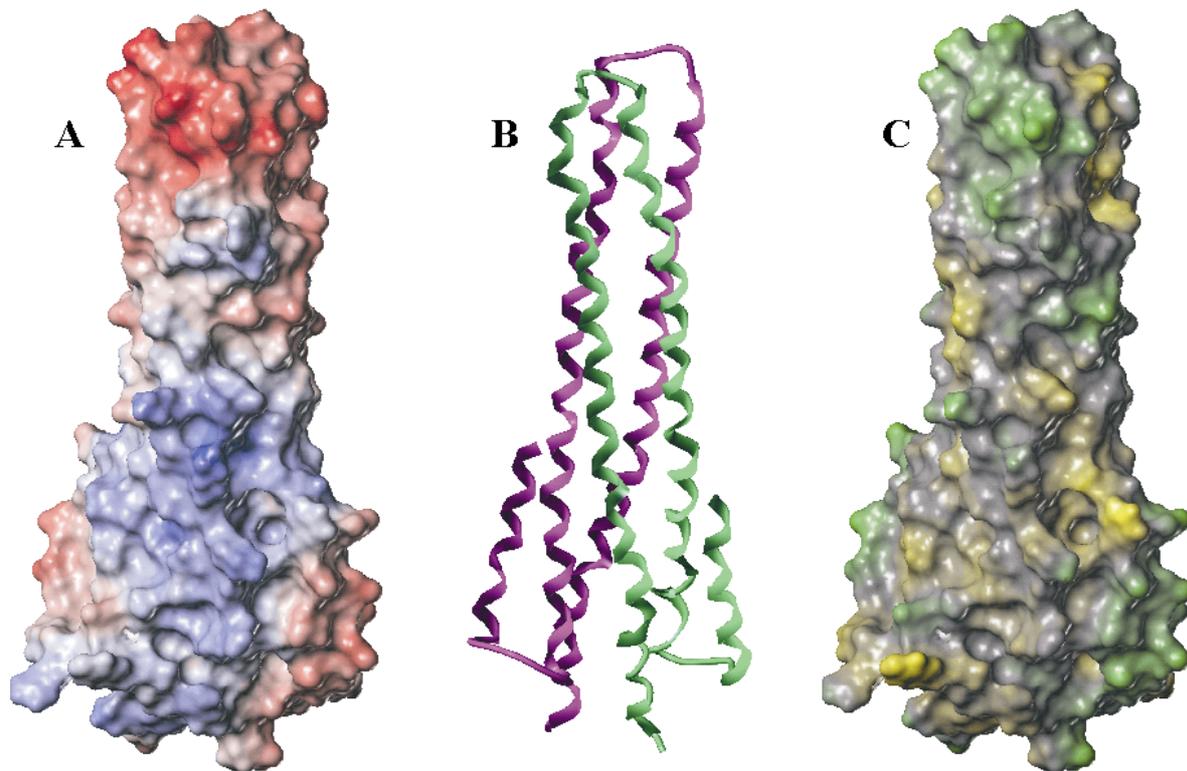
**Abb. 3.36.** Untersuchungen zur Temperaturstabilität von Occludin<sub>406-521</sub> bei 4 °C und Raumtemperatur. Die Proben wurden für die angegebenen Zeiten bei den beiden Temperaturen inkubiert und anschließend bis zum Auftragen auf SDS-Gele bei  $-20$  °C gelagert.

### 3.6. Dimere Homologiemodelle von Occludin und ZO-1

Die elektrostatischen Potentiale der Monomermodelle von Occludin und der SH3-Hinge-GUK-Einheit von ZO-1 hatten keine ausreichenden Komplementaritätsmuster in Größe und Eigenschaften, die für eine 1:1 intermolekulare Interaktion passten (negatives Occludin zu positivem ZO1-SH3-Hinge-GUK, Abb. 3.14). Nur  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> (VH3) und die SH3-Hinge-GUK-Einheit von ZO-1 zeigten komplementäre Eigenschaften an ihren Oberflächen (Abb. 3.15.D, E). Experimentelle Ergebnisse SEC, MS und DLS sowie SPR deuten ebenfalls auf eine Di- bzw. Oligomerisierung von Occludin und ZO-1 hin (Abschnitte 3.3 und 3.5). Deshalb wurden im Folgenden von Occludin<sub>406-521</sub> und ZO-1<sub>518-806</sub> noch weitere Modelle von Dimere und Oligomere generiert.

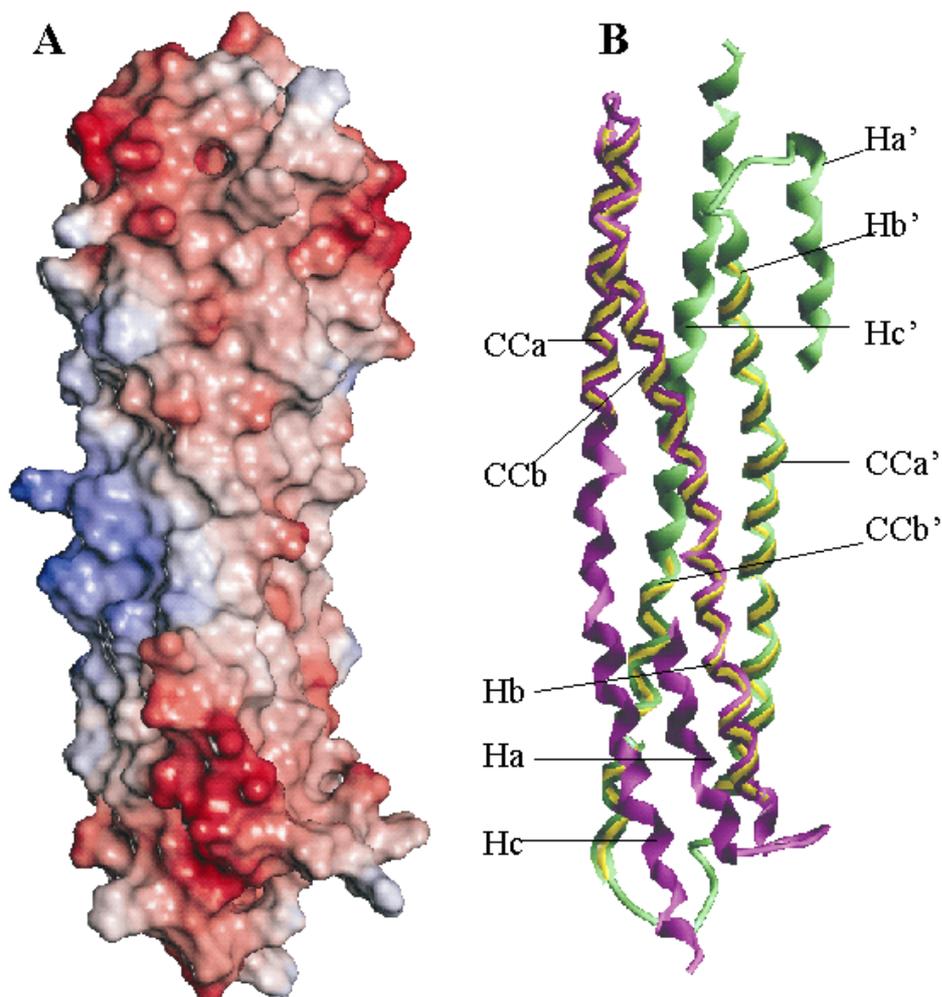
#### 3.6.1. Dimermodelle von Occludin

Die experimentellen Daten von Punkt 3.5. lieferten gute Beweise, dass Occludin<sub>406-521</sub> hauptsächlich in einer dimeren Form vorliegt.



**Abb. 3.37.** Paralleles Dimermodell von Occludin<sub>400-521</sub> basierend auf der Kristallstruktur eines Serin-Chemotaxis-Rezeptors (PDB-Nr. 1QU7). **A)** Elektrostatische Potentialoberfläche (rot = negative Ladung; blau = positive Ladung) **B)** Bänderdarstellung des Proteinrückgrats mit den einzelnen Occludinmonomeren in violett bzw. grün. **C)** Lipophile Potentialoberfläche (gelb = lipophil, grün = hydrophil).

Es wurde auch eine Bindung eines Occludinpeptids aus der CC-Region von Occludin mit Occludin aus Zellextrakten beobachtet (Nusrat et al., 2000b). Dabei wurde humanes Occludin<sub>440-469</sub> verwendet, das der Mausequenz Occludin<sub>439-468</sub> entspricht. Außerdem zeigte das Occludinmonomermodell keine guten komplementären Muster zum SH3-Hinge-GUK-Modell von ZO-1 (Abb. 3.14). Aus diesen Gründen generierten wir Homodimermodelle für die CC-Domäne von Occludin. Dafür wurde die basische Helix Oc-Hc zur sauren Oc-Ha Helix umgeklappt, wie es auch für eine Helix bei  $\alpha$ -Catenin beschrieben wurde, die umklappt, wenn es an  $\beta$ -Catenin bindet (Pokutta und Weiss, 2000). So erhielten wir im Occludin Monomer zwei lange Helices (aus Hb/CCa und CCb/Hc), die im Dimer als Vierhelixbündel nach der strukturellen Vorlage (PDB: 1QU7 von der Vierhelixbündelstruktur der zytoplasmatischen Domäne eines Serin-Chemotaxis-Rezeptors) angeordnet wurden.



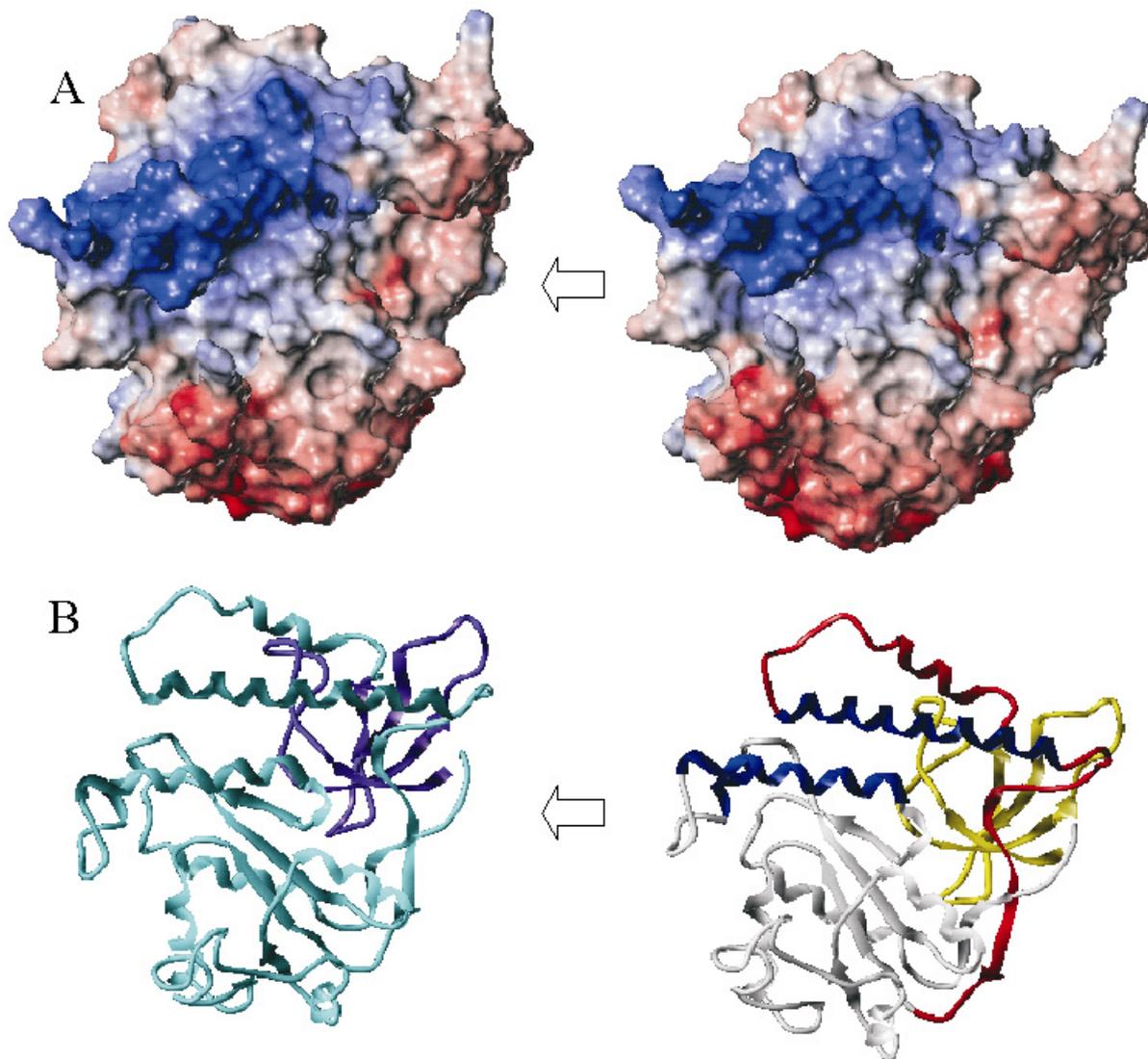
**Abb. 3.38.** Antiparalleles Dimermodell von Occludin<sub>400-521</sub> basierend auf der Kristallstruktur eines Serin-Chemotaxis-Rezeptors (PDB-Nr. 1QU7). **A**) Elektrostatische Potentialoberfläche (rot = negative Ladung; blau = positive Ladung) **B**) Bänderdarstellung des Proteinrückgrats mit den einzelnen Occludinmonomeren in violett bzw. grün und CC-Bereichen als innere gelbe Linie. Beschriftungen wie in Abb. 3.10.

Die Oc-Ha Helices wurden mit der bekannten Vorlage (PDB: 1BF5 siehe unter Punkt 3.2.1) modelliert. Prinzipiell gab es zwei Möglichkeiten, die beiden Monomere im Dimer anzuordnen: parallel oder antiparallel. Im parallelen Dimermodell trafen die stark negativ geladenen Turnbereiche zwischen CCa und CCb der beiden Monomeren aufeinander, was zu einer elektrostatisch ungünstigen Interaktion führte (Abb. 3.37). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass das Occludindimer in der Realität so aufgebaut ist.

Im antiparallelen Dimermodell der CC-Domäne von Occludin bewirken die negativ geladenen Helix-Turn-Helix-Regionen große Bereiche mit negativem elektrostatischen Potential an beiden Enden des Helixbündels. Diese Bereiche sind durch negative Ladungen verbunden, die von Oc-CCa stammen, was zusammen ein großes durchgehendes elektrostatisches Potential auf einer Seite der Oberfläche bildet (Abb. 3.38). Dieses Modell ist nicht nur dem Vierhelixbündel der Kristallstruktur von  $\alpha$ -Catenin (PDB: 1H6G<sub>509-630</sub>; Yang et al., 2001) sehr ähnlich, sondern es bildet darüber hinaus ein zusammenhängendes negatives elektrostatisches Potential wie  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> (Abb. 3.15.D). Die Linkerregion (AS 634-698) zwischen VH2 und VH3, die größtenteils nicht in dem VH3-Modell von  $\alpha$ -Catenin enthalten ist, weist einen starken Überschuss an sauren Aminosäuren auf, was das negative elektrostatische Potential des gemessenen  $\alpha$ -Catenin-Konstrukts sehr wahrscheinlich noch verstärkt. Peptide aus dieser sauren Verbindungsregion banden jedenfalls die basischen ZO-1 Peptide CC1 und H2 (Abb. 3.23).

### 3.6.2. ZO-1-Dimermodelle

Wie experimentell unter Punkt 3.3.3. nachgewiesen wurde, können auch GUK-Bereiche von ZO-1 miteinander interagieren. Außerdem ist das in Abb. 3.38 gezeigte Occludindimer groß genug, um zwei SH3-Hinge-GUK-Moleküle von ZO-1 zu binden. Als plausible Interaktionsregionen, auch aus den Experimenten abgeleitet, kamen der langgestreckte saure Bereich im Occludindimermodell (aus Ha, Hb, CCa und CCb) und der basische Bereich von ZO-1-SH3-Hinge-GUK (aus CC1, H1 und H2) in Betracht. Für das Dimermodell des SH3-Hinge-GUK Bereichs von ZO-1 wurden zwei Monomere so zusammengesetzt, dass ihre zwei positiven Bereiche des elektrostatischen Potentials ein zusammenhängendes längliches Areal bildeten. Der Kontaktbereich der Monomere passt dabei von der Form recht gut zusammen, während keine starken überwiegenden elektrostatischen Bereiche dort zu sehen waren (Abb. 3.39). Nach dem Zusammensetzen wurde das ZO-1-Dimer erneut minimiert und die elektrostatischen und lipophilen Oberflächen neu berechnet (Abb. 3.40).

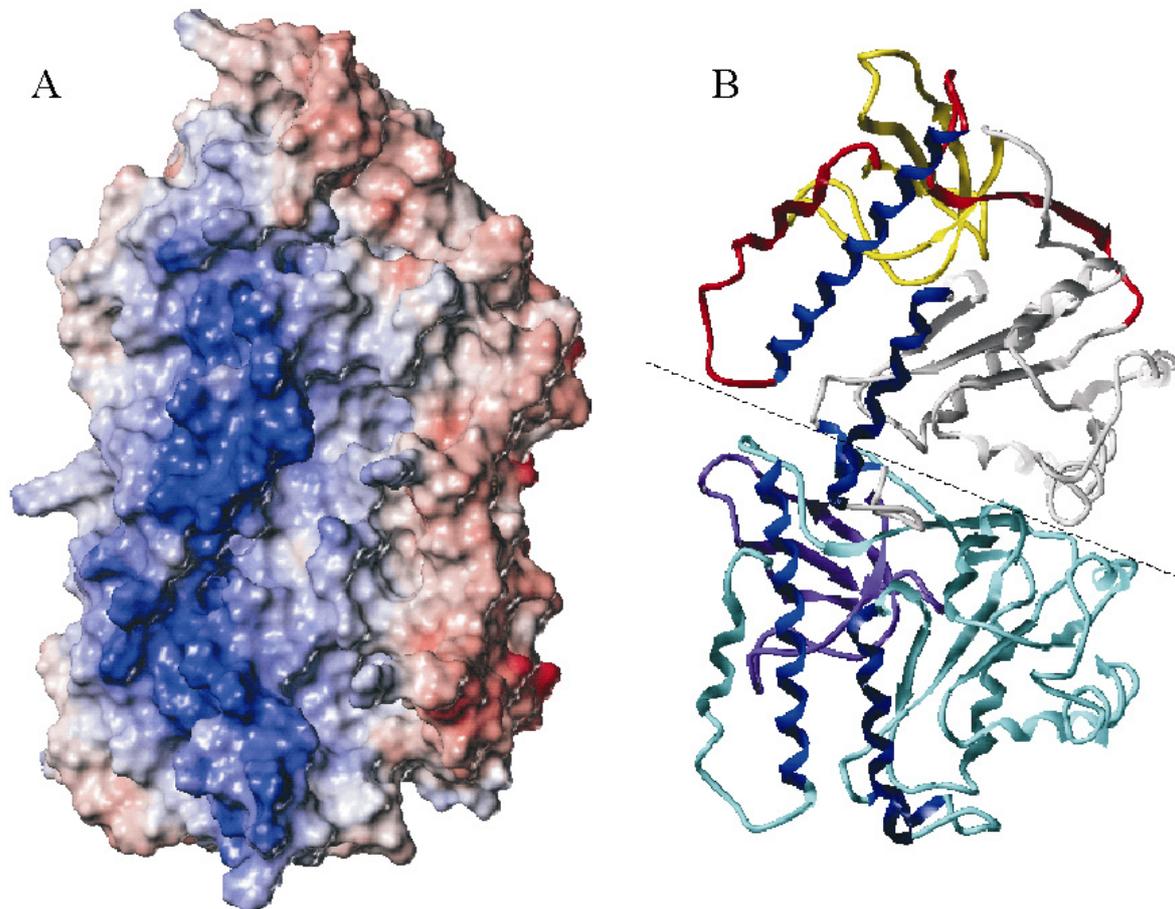


**Abb. 3.39.** Vorstellung wie zwei Monomermodelle von (ZO-1<sub>518-806</sub>) (siehe Abb. 3.13) zu einem Dimermodell zusammengesetzt werden. **A)** Elektrostatische Potentialoberfläche (rot = negative Ladung; blau = positive Ladung) **B)** Darstellung des Proteinrückrads; linkes ZO-1-Monomer: SH3 = violett, Hinge und GUK= hellblau; rechtes ZO-1-Monomer mit SH3 = gelb, Hinge = rot, CC1, H1 und H2 = dunkelblau; GUK = hellgrau. Ein von Helix H1 und Teilen von H2 gebildeter hervorstehender Bereich im rechten ZO-1-Monomer passt in eine Vertiefung im linken ZO-1-Monomer (Pfeile).

Dieses Modell zeigt hinsichtlich Form und elektrostatischem Potential ein exakt komplementäres Muster zu dem Occludindimer. Die möglichen Hauptinteraktionsbereiche sind durch Pfeile in Abb. 3.41 gekennzeichnet, die Abb. 3.38. und 3.40. zusammenfasst.

Das ZO-1-Modell (Abb. 3.40) ist konsistent mit der möglichen Bildung eines offenen Oligomers durch einen Domänen austausch von SH3 und GUK in der Hingeregion, wie es schon früher vorgeschlagen worden war (McGee et al., 2001). Dabei lagert sich die Hingeregion des oberen Moleküls um und die SH3 nimmt den Platz von SH3' ein. Was vorher SH3 bzw. GUK' war, gehört dann zu weiteren ZO-1-Molekülen. Die Wechselwirkung zwischen den  $\beta$ -Strängen A-D der SH3-Domäne und den  $\beta$ -Strängen E und F, welche die

GUK-Domäne flankieren, bleibt dabei erhalten, nur gehören jetzt die entsprechenden Domänen nicht mehr zum selben Molekül (Abb. 4.3).

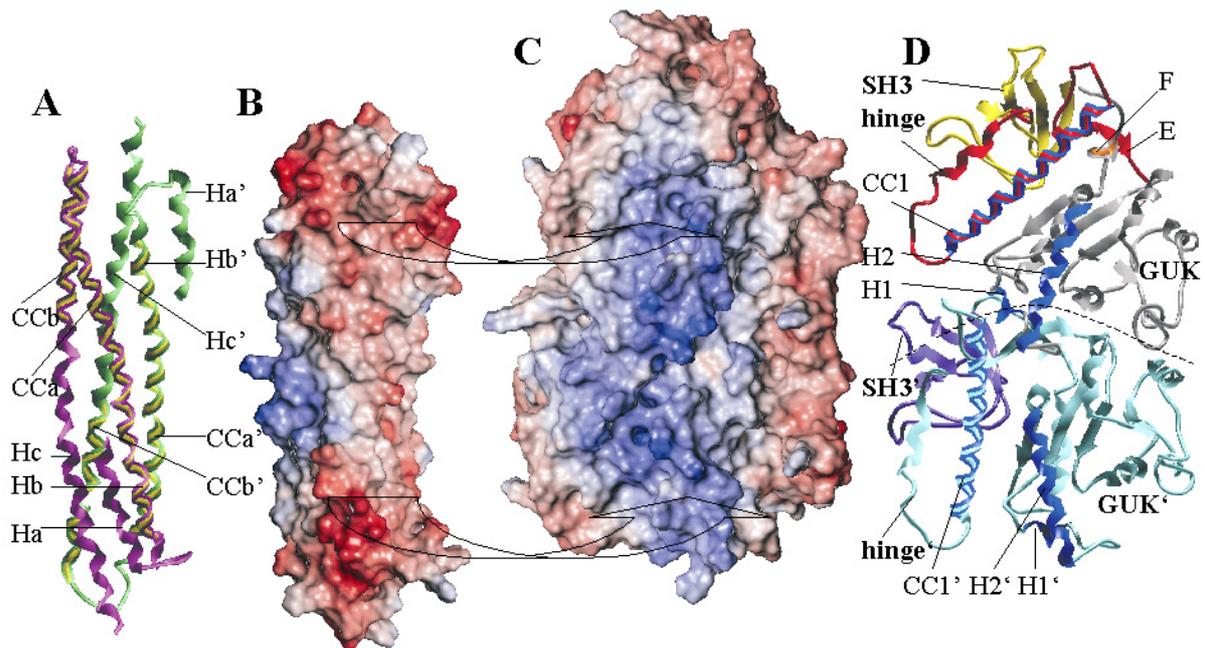


**Abb. 3.40.** Dimermodell von ZO-1<sub>518-806</sub> **A)** Elektrostatische Potentialoberfläche (rot = negative Ladung; blau = positive Ladung) **B)** Darstellung des Proteinrückrads: oberes ZO-1-Monomer mit SH3 = gelb, Hinge = rot, CC1, H1 und H2 = dunkelblau, GUK = hellgrau; unteres ZO-1-Monomer SH3 = violett; Hinge und GUK = hellblau. Die Strichellinie zeigt die ungefähre Grenze zwischen den Monomeren an. Nur der vorstehende Bereich des oberen (in Abb. 3.39 das rechte) ZO-1-Monomers ragt darüber hinaus.

### 3.6.3. Zusammenfassung der biophysikalischen Untersuchungen und der Vergleich mit den Dimermodellen

Das untersuchte Occludinfragment ist bei 4 °C einige Wochen stabil, zerfällt jedoch bei RT schon nach einigen Tagen. Es besteht überwiegend aus Helices (CD). Unterschiedliche Methoden weisen darauf hin, dass es hauptsächlich als Dimer vorliegt (SEC, MS, DLS). Nicht bei allen Methoden konnten die Messungen jedoch vollständig ausgewertet werden (AUZ). Für die entgeltige Strukturaufklärung durch Röntgenkristallografie wurden mit der Entwicklung von Protokollen zur Proteinaufreinigung, MBP-Abspaltung und der Herstellung von Proteinkristallen die ersten Schritte getan. Auch für ZO-1 gab es Hinweise auf

Oligomerisierungen (SPR). Die Dimermodelle von Occludin und ZO-1 passen von Oberflächenform und Ladungsverteilung sehr gut zusammen. Mit dem *Domainswapping* der SH3- und GUK-Domänen von ZO-1 existiert ein Mechanismus, wie sehr lange Oligomere entstehen könnten. Diese bilden damit vielleicht die Grundlage für die zellumspannenden TJ-Stränge.



**Abb. 3.41.** Architektonische/strukturelle Dimermodelle von Occludin-C-Terminus (aus Abb. 3.38) und der ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Einheit (aus Abb. 3.40) in gleichem Maßstab. **A)** Occludin-Homodimermodell (Proteinrückrad der zwei Monomere in magenta bzw. grün) basierten auf der Kristallstruktur des Serin-Chemotaxis-Rezeptors (PDB: 1QU7). Im Gegensatz zum Monomermodell sind hier im Dimer Hc und Hc' (mit Überschuss an positiven Ladungen) zu den Helices Ha und Ha' (mit Überschuss an negativen Ladungen) umgeklappt. Helices mit CC-Vorhersage (Hb [teilweise CC], CCa, CCb und Hb' [teilweise CC], CCa', CCb') sind zweifarbig mit einem gelben Streifen in der Mitte. **B)** Das resultierende elektrostatische Potential des Occludindimers zeigt an der molekularen Oberfläche große negative Bereiche (rot) an den zwei Enden verbunden durch negatives Potential verursacht von CCa und CCa'. Der resultierende zusammenhängende Bereich mit negativem elektrostatischen Potential auf der rechten Seite des dimeren Occludinmodells passt (Pfeile) von der Größe und den komplementären Ladungseigenschaften zu dem positiven elektrostatischen Potential eines dimeren ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Modells (**C**). **D)** Proteinrückrad von ZO-1-Homodimer (Monomere über und unter der gestrichelten Linie); CC-Vorhersagen (CC1 und CC1') sind zweifarbig, sonst Farben wie bei Abb. 3.40. Abkürzungen siehe Abb. 3.7.