

Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Funktion des Tight Junction-Proteins Occludin

DISSERTATION

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

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

vorgelegt von
Max J. Dörfel
(aus Berlin)

BERLIN 04/2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2006 bis April 2010 am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Prof. Dr. Rudolf Tauber) der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, unter der Leitung von Prof. Dr. Otmar Huber angefertigt.

- 1. GUTACHTER:** **PROF. DR. OTMAR HUBER**
 INSTITUT FÜR BIOCHEMIE II
 FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA
- 2. GUTACHTER:** **PROF. DR. PETRA KNAUS**
 INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOCHEMIE
 FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

Disputation am 21.06.2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Otmar Huber** für die Vergabe dieses interessanten Themas, für die exzellente fachliche Betreuung sowie für die vielen Ideen zur Lösung diverser Probleme bedanken. Ich danke ebenfalls **Prof. Dr. Rudolf Tauber** für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut unter hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen anzufertigen. Frau **Prof. Dr. Petra Knaus** danke ich, dass sie sich als Zweitgutachter meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat und den wissenschaftlichen Austausch von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenter Weise gefördert hat.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei der DFG Forschergruppe 721 und im Besonderen bei **Dr. Susanne Krug** und **Prof. Dr. Michael Fromm** für die Widerstände und die Unterstützung in elektrophysiologischen Fragen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Instituts gilt mein Dank für das sehr gute Arbeitsklima und die gute Stimmung im Labor. Im Besonderen bedanke ich mich bei **Barbara a.k.a Luise Kosel** - dem letzten Mohikaner des Labors - für die Möglichkeit an ihrem breiten Erfahrungsschatz teilhaben zu können. Ebenfalls danke ich **Dr. Jörg „alte Puppe“ Weiske** - unserem verschollenen Sohn - für die Inspiration in der guten alten Zeit. Mein Dank gilt ebenfalls **Dr. Kai „Scheffe“ Albring** für die wissenschaftlichen Diskussionen und die sporadisch eingebrachten Albrings, deren Niveau ich selten unterbieten konnte. Ich bedanke mich herzlich bei **Sonnild „Eva“ Mittag** - einer Frau, an der man nicht vorbeikommt - für ihren Enthusiasmus und ihr Engagement. Ganz besonders möchte ich mich bei **Dr. (Lösungsmittel-) Julie Westphal** - meiner tichte Kollegin - für die Konstanz danken und dafür, dass ich an so manchen Veränderungen teilhaben durfte. Ebenso danke ich **Sebastian „Sepp“ Riese** - dem selbsternannten Urgestein des Instituts und Verwalter des inoffiziellen Lagers - für's pausieren im Treppenhaus.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und besonders bei **Fabian Schmidt** und **Kirsten Vormbrock** für die Zerstreuung bedanken. Und natürlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, ohne deren ständige rückhaltlose Förderung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

PS: Danke **Katja „Chaos“ Grollich** - für alles.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Tight Junctions (TJ)	4
1.1.1. Junctional Adhesion Molecule (JAM)	5
1.1.2. Die Claudin-Proteinfamilie	6
1.1.3. Die Zonula occludens Proteine (ZO-Proteine)	6
1.1.4. Tricellulin	7
1.2 Occludin	7
1.2.1. Die Funktion von Occludin	8
1.2.2. Phosphorylierung von Occludin	9
1.2.3. Phosphorylierung von Occludin durch CKI und CKII	11
1.3 Zielsetzung	12
2. MATERIALIEN	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Molekularbiologische Materialien	16
2.3.1. cDNAs	16
2.3.2. Expressionsvektoren	16
2.3.3. Oligonukleotide und Primer	17
2.3.4. Bakterienstämme	19
2.4 Proteinbiochemische Materialien	19
2.4.1. Molekulargewichtsstandards	19
2.4.2. Antikörper	19
2.4.3. Enzyme	21
2.5 Zellkultur	21
2.5.1. Medien und Lösungen	21
2.5.2. Eukaryontische Zelllinien	21
2.6 Reaktionskits	22
2.7 Geräte	22

2.7.1.	Zentrifugen	22
2.7.2.	Elektrophorese und Western Blot	22
2.7.3.	Bakterien und Zellkultur	23
2.7.4.	Sonstige Geräte	23

3. METHODEN **24**

3.1	Molekularbiologische Methoden	24
3.1.1.	PCR zur Amplifizierung von Konstrukten	24
3.1.2.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	24
3.1.3.	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	25
3.1.4.	Verdau von DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen	25
3.1.5.	Phenol-Chloroform-Extraktion	25
3.1.6.	Ethanol-fällung von DNA	26
3.1.7.	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	26
3.1.8.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
3.1.9.	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	27
3.1.10.	Hitzeschock-Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	27
3.1.11.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
3.1.12.	DNA-Sequenzierung	28
3.1.13.	Ortspezifische Mutagenese	29
3.2	Proteinbiochemische Methoden	30
3.2.1.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	30
3.2.2.	Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	31
3.2.3.	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	31
3.2.4.	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	32
3.2.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	33
3.2.6.	Proteinbestimmung: BCA-Assay	33
3.2.7.	Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	33
3.2.7.1.	<i>GST- und MBP-getaggte Proteine</i>	35
3.2.7.2.	<i>His₆-getaggte Proteine (nativ)</i>	35
3.2.8.	Dialyse von Proteinlösungen	35
3.2.9.	<i>In vitro</i> -Assoziation von MBP- und GST-Fusionsproteinen (Pull-Down-Assay)	36
3.2.9.1.	<i>Interaktion von Occludin mit CKI und CKII</i>	36
3.2.9.2.	<i>Interaktion von Occludin mit ZO-2 in MDCK-Zelllysaten</i>	37

3.2.9.3.	<i>Interaktion von Occludin mit ZO-1</i>	37
3.2.10.	Co-Immünpräzipitation (IP)	37
3.2.10.1.	<i>Nachweis von Occludin-Casein-Kinase-Komplexen in HEK-293-Zelllysaten</i>	38
3.2.10.2.	<i>Nachweis von Occludin-ZO-2-Komplexen in MDCK-Zelllysaten</i>	38
3.2.11.	In vitro-Phosphorylierung	38
3.3	Zellkultur	39
3.3.1.	Kultivierung von Zellen	39
3.3.2.	Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer	40
3.3.3.	Einfrieren von Zellen	40
3.3.4.	Auftauen von Zellen	40
3.3.5.	Transiente Transfektion von Zellen	41
3.3.5.1.	<i>Calciumphosphat-Transfektion</i>	41
3.3.5.2.	<i>Transfektion mit Fugene[®]HD</i>	41
3.3.5.3.	<i>Transfektion mit TurboFect[™]</i>	41
3.3.6.	Stabile Transfektion von Zellen	42
3.3.7.	Lyse eukaryotischer Zellen	42
3.3.8.	Indirekte Immunfluoreszenz	43
3.3.9.	Calcium-Switch-Experimente	43
3.3.10.	Widerstandsmessungen	44
3.3.11.	Proliferationsassay	45
3.3.12.	MALDI	46
4.	ERGEBNISSE	47
4.1	Interaktion von Occludin mit Kinasen	47
4.1.1.	Interaktion von Occludin mit CKI und CKII	47
4.1.2.	Direkte Interaktion von Occludin mit CKI und CKII	48
4.2	Phosphorylierung von Occludin	50
4.2.1.	Identifizierung von CKI-Phosphorylierungsstellen	51
4.2.2.	Identifizierung von CKII-Phosphorylierungsstellen in Occludin	53
4.2.3.	Serielle Phosphorylierung durch GSK3 β	55
4.3	CKII-abhängige Interaktion von Occludin mit ZO-1 und -2	57
4.3.1.	Direkte Interaktion von Occludin und ZO-1	57
4.3.2.	Charakterisierung der Occludin-ZO-2-Interaktion in MDCK-Zellen	59

4.4	Physiologische Bedeutung der CKII-abhängigen Phosphorylierung	61
4.4.1.	Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf die Assemblierung der TJs	63
4.4.2.	Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf die Barriereigenschaften der TJs	65
4.4.3.	Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf Proliferation	67
5.	DISKUSSION	68
5.1	Occludin interagiert mit den Kinasen CKI und CKII	68
5.2	CKI phosphoryliert Occludin	69
5.3	CKII phosphoryliert Occludin an den Aminosäuren T400, T404 und S408	70
5.4	Phosphorylierung von Occludin durch GSK3β	71
5.5	Die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin moduliert die Interaktion zwischen Occludin und den ZO-Proteinen	72
5.5.1.	Interaktion von Occludin und ZO-2	73
5.5.2.	Interaktion von Occludin und ZO-1	73
5.6	Die physiologische Bedeutung der CKII-abhängigen Phosphorylierung von Occludin	74
5.6.1.	Lokalisation der Occludin-Konstrukte	74
5.6.2.	Dissoziation und Reassemblierung der Tight Junctions	75
5.6.3.	Transepithelialer Widerstand	76
5.6.4.	Proliferation	78
6.	ZUSAMMENFASSUNG	80
7.	SUMMARY	82
8.	LITERATUR	84
9.	ANHANG	94

1. Einleitung

Zell-Zell-Verbindungen sind ein entscheidendes Merkmal epithelialer und endothelialer Gewebe (s. Abb. 1). Diese Verbindungen sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, wie der Immunantwort oder der Invasion von Tumorzellen. Sie verbinden die Kontaktbereiche der Zellen mit dem Cytoskelett, und beeinflussen so die Morphogenese von Geweben. Darüber hinaus sichern sie die Polarität der Zellen, integrieren zahlreiche Signalwege und bilden eine parazelluläre Barriere für Ionen [Miyoshi and Takai, 2008]. Der zuoberst gelegene, d.h. der am weitesten in apikale Regionen ausgedehnte, abdichtende Bereich auf der lateralen Zellmembran wird Zonula occludens genannt und besteht aus Tight Junction Strängen.

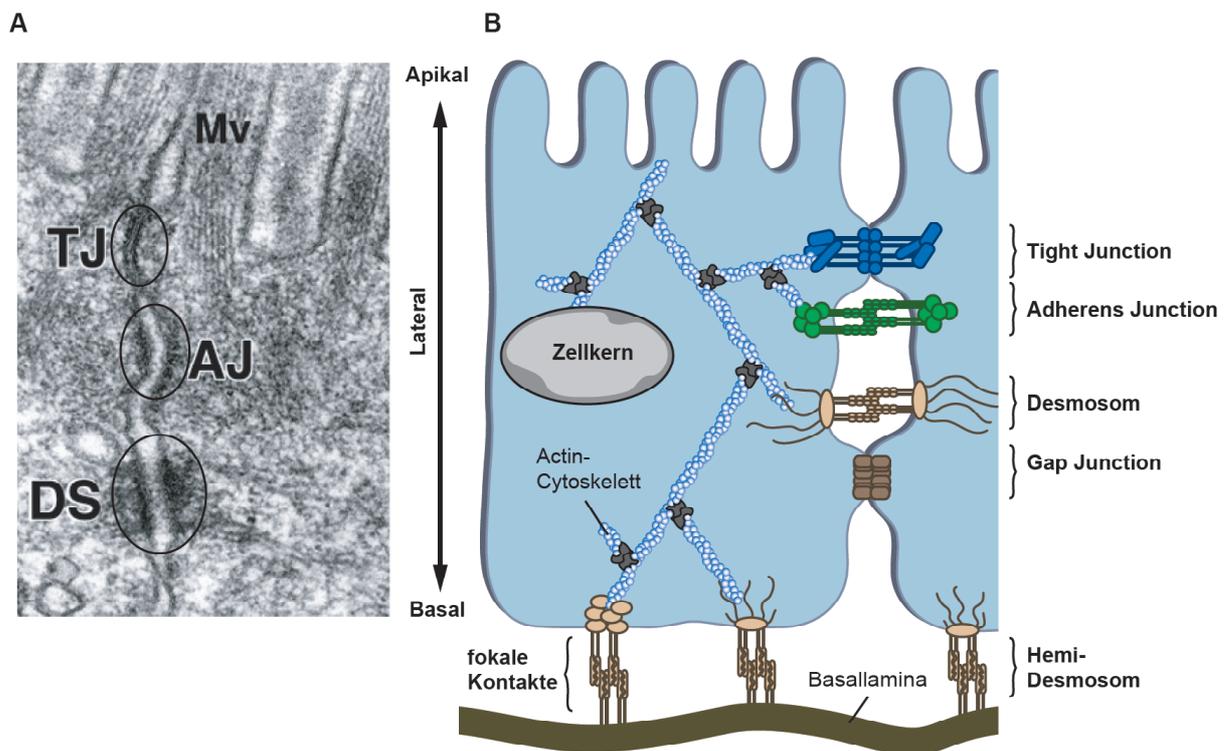


Abb. 1: Zell-Zell-Verbindungen. In polarisierten epithelialen und endothelialen Zellen treten verschiedene Zell-Zell-Verbindungen auf. **A)** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer epithelialen Zelle (Mv, Mikrovilli; TJ, Tight Junction; AJ, Adhärenz Junctions; DS, Desmosom) [Tsukita et al., 2001]. **B.)** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Zell-Zell-Verbindungen. Auf der apikalen Seite sorgen Tight Junctions für eine Regulation des parazellulären Transportweges. Darunter liegen die Adhärenz Junctions und die Desmosomen, die hauptsächlich die Adhäsion benachbarter Zellen vermitteln. Gap-Junctions vermitteln die Weiterleitung von elektrischen und chemischen Signalen (z. B.: cAMP). Auf der basalen Seite sind die Zellen über fokale Kontakte und Hemidesmosomen mit der extrazellulären Matrix verbunden.

Direkt unterhalb der Zonula occludens liegt die Zonula adherens, ein Bereich, der durch die Adherens Junctions charakterisiert ist. Während in Epithelien zusätzlich zu den Tight Junctions und den Adherens Junctions Desmosomen als punktförmige Kontaktstrukturen auftreten, liegen diese in Endothelien nicht vor [Bazzoni and Dejana, 2004]. Eine weitere Zell-Zell-Kontaktstruktur bilden die Gap Junctions, welche jedoch keine starken Adhäsionseigenschaften besitzen.

Gap Junctions sind Cluster kleiner Kanäle, die aus Proteinen der Familie der Connexine aufgebaut sind. Diese Tetraspan-Transmembranproteine besitzen zwei extrazelluläre Loops, die bei der Zell-Zell-Erkennung eine Rolle spielen. Jeweils 6 Connexine lagern sich zu einem Halbkanal, auch Connexon genannt, zusammen (s. Abb. 2). Die Halbkanäle benachbarter Zellen bilden zusammen eine Pore für Ionen und kleine Moleküle. Sie verbinden das Cytoplasma anliegender Zellen und erlauben den Austausch von Metaboliten, Ionen und second messenger-Molekülen. Darüber hinaus vermitteln sie die elektrische Zell-Zell-Kommunikation.

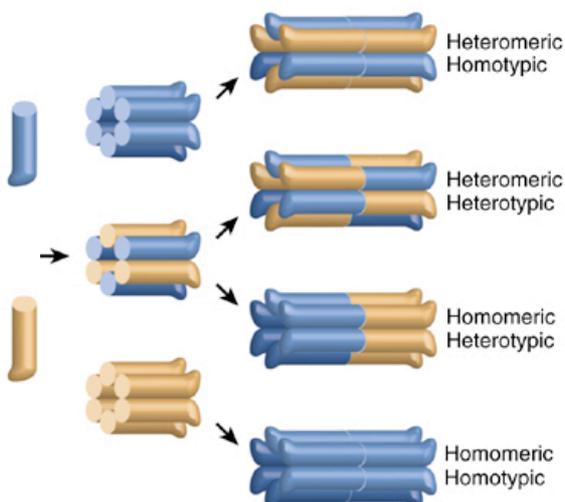


Abb. 2: Struktur der Gap Junctions. Unterschiedliche Connexine können selektiv miteinander interagieren und homomere oder heteromere Halbkanäle, so genannte Connexone, bilden. Je nach Aufbau der Connexone verbinden sich zwei Halbkanäle zu homotypischen oder heterotypischen Kanälen [Mese et al., 2007].

Desmosomen (griech.: δεσμος, desmos = Verbindung; σωμα; soma = Körper) sind Zell-Zell-Verbindungen, die hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zellschicht dienen. Dabei verankern die Plaque-Proteine Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin Intermediärfilamente mit den cytoplasmatischen Domänen der desmosomalen Cadherine Desmoglein 1-4 und Desmocollin 1-3 und verknüpfen so die Desmosomen mit dem Cytoskelett.

Adherens Junctions (AJ) liegen unterhalb der Tight Junctions und bestehen aus Transmembranproteinen der Cadherin-Proteinfamilie, die Calcium-abhängig eine homophile Interaktion mit Cadherinen einer Nachbarzelle ausbilden und in multimeren Komplexen entlang der Zellgrenze polymerisieren (s. Abb. 4) [Hartsock and Nelson, 2008]. Über ihre C-terminalen Domänen assoziieren sie mit β -Catenin und γ -Catenin (Plakoglobin) und verbinden so diese Transmembranproteine über α -Catenin und weitere Komponenten wie Vinculin, Actinin und Eplin [Abe and Takeichi, 2008] mit dem Actin-Cytoskelett [Nelson and Nusse, 2004]. Dabei scheint α -Catenin allerdings weniger als Linker zwischen dem E-Cadherin/ β -Catenin-Komplex zu fungieren, sondern vielmehr das Actin-Netzwerk durch Hemmung des Arp2/3-Komplexes zu regulieren [Weis and Nelson, 2006; Yamada et al., 2005].

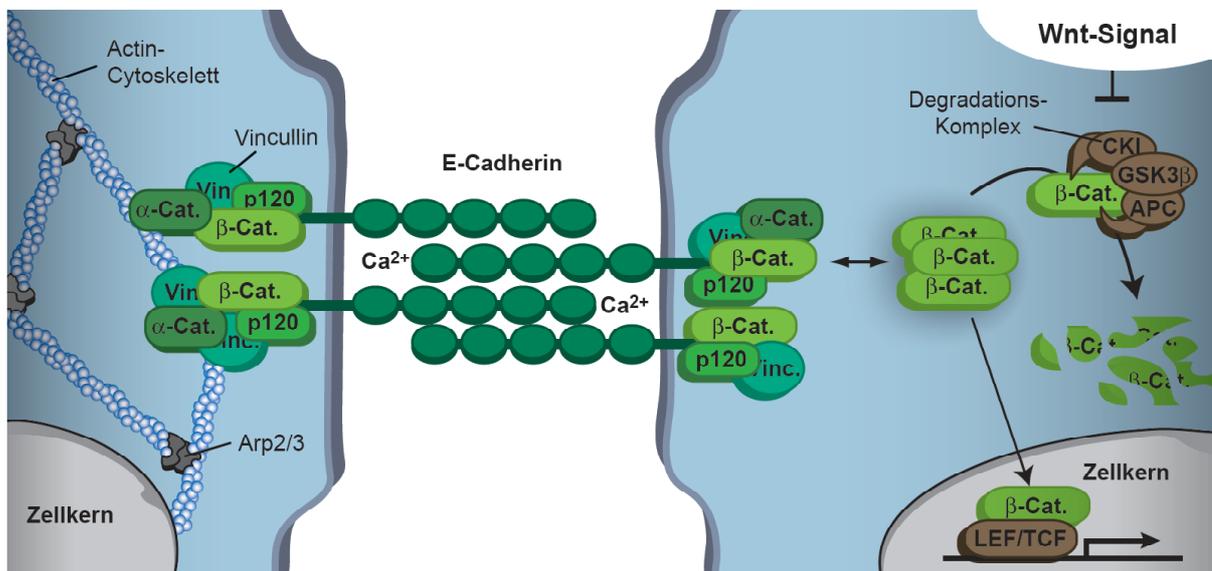


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Adherens Junctions. E-Cadherin vermittelt die calciumabhängige Interaktion benachbarter Zellen. Auf der cytoplasmatischen Seite sind β -Catenin und weitere Proteine wie z. B. α -Catenin, p120 und Vinculin an E-Cadherin assoziiert, wodurch der Cadherin/Catenin-Komplex mit dem Actin-Cytoskelett verbunden wird (links). Darüber hinaus existiert ein cytosolischer Pool von β -Catenin (rechts), der über proteosomalen Abbau reguliert wird. Bei Stimulation durch Wnt-Moleküle wird der β -Catenin Degradationskomplex inhibiert, β -Catenin transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Wnt-abhängige Transkription im Zusammenspiel mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren.

Neben der wichtigen Funktion der Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsion, besitzen AJ zusätzlich die Fähigkeit zur Integration von Signalen. So spielt β -Catenin beispielsweise eine zentrale Rolle im Wnt-Signalwege. Cytosolisch vorliegendes β -Catenin wird durch den Degradationskomplex, bestehend aus Axin, APC (adenomatous polyposis coli), GSK3 β (Glycogensynthase Kinase-3 β) und CK1 α (casein kinase 1 α), phosphoryliert und so für den proteosomalen Abbau markiert [Daugherty and Gottardi, 2007]. Die Bindung von Wnt-

Molekülen an den Frizzled-Rezeptor führt zur Aktivierung des Signalweges und einer Inhibierung des Degradationskomplexes. So wird β -Catenin stabilisiert, transloziert in den Zellkern und kann über LEF/TCF (lymphocyte enhancer factor/T-cell factor) Transkriptionsfaktoren die Wnt-abhängige Transkription regulieren [Jin et al., 2008]. Durch diese Signalfunktion werden zahlreiche biologische Prozesse, einschließlich Entwicklung und Differenzierung, kontrolliert [Gavert and Ben-Ze'ev, 2007].

1.1 Tight Junctions (TJ)

Apikal der AJ liegen die Tight Junctions. Diese Zell-Zell-Verbindungen sind ebenfalls aus Multiprotein-Komplexen aufgebaut und bilden häufig eine morphologische und physikalische Grenze zwischen luminalen Hohlräumen und Geweben, d. h. sie formen einerseits eine semipermeable Barriere für den parazellulären Transport von Ionen, Soluten und Wasser (Gate-Funktion; Abb. 4A) und bilden andererseits eine Diffusionsbarriere für Membranproteine (Fence-Funktion). Dadurch sichern sie die Polarität der Zellen und ermöglichen einen gerichteten transzellulären Transport über membrangebundene Transportproteine von der apikalen zur basolateralen Seite des Epithels [Chiba et al., 2008]. Darüber hinaus koordinieren sie eine Reihe von Signal- und Trafficking-Molekülen und regulieren so Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose [Tsukita et al., 2008].

Die Barriereigenschaften der TJs sind unentbehrlich für die Funktion eines Epithels z. B. des Darmlumens oder dem Endothel der Blut-Hirn-Schranke. Daher sind entzündliche Darmerkrankungen (z. B.: Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa) oder chronische Erkrankungen des zentralen Nervensystems (z. B.: Multiple Sklerose) oft mit Veränderungen der Tight Junctions assoziiert [Forster, 2008].

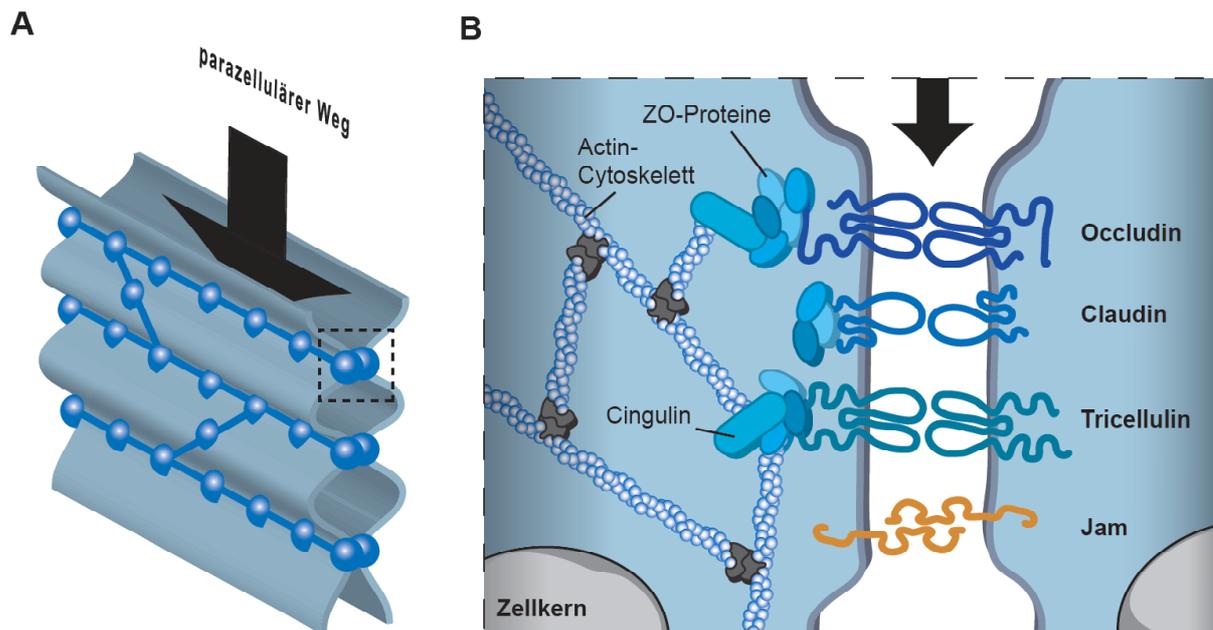


Abb. 4: Aufbau und Funktion der Tight Junctions. TJs verbinden die Membranen benachbarter Zellen. A.) Sie bilden perlschnurartige Stränge, die sich entlang der lateralen Membran um die Zellen ziehen und regulieren so den parazellulären Transport von Soluten. B.) Die Transmembranproteine Occludin, JAM, Tricellulin sowie die Proteine der Claudin-Familie verbinden das Cytoskelett benachbarter Zellen über cytoplasmatisch assoziierte ZO-Proteine und dichten über die extrazellulären Domänen den Interzellularraum ab.

Zu den prominentesten Mitgliedern der Tight Junctions (Abb. 4B) gehören die integralen Membranproteine Occludin, Tricellulin, JAM (junctional adhesion molecule) und die Proteine der Claudin-Familie sowie viele cytoplasmatisch assoziierte Scaffold-Moleküle wie z.B. die Zonula occludens-Proteine ZO-1, -2 und -3 [Dejana, 2004].

1.1.1. Junctional Adhesion Molecule (JAM)

JAMs sind glycosylierte Transmembranproteine der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie, die durch zwei extrazelluläre Ig-Domänen, einer Transmembranregion sowie einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne charakterisiert sind [Chiba et al., 2008]. Sie lokalisieren in interzellulären Zell-Zell-Verbindungen in endothelialen und epithelialen Zellen, können aber auch auf zirkulierenden Leukozyten oder Thrombozyten exprimiert werden [Bazzoni, 2003]. JAM-Proteine werden in zwei Subgruppen unterteilt, wobei erstere von JAM-A, -B und -C gebildet wird [Aurrand-Lions et al., 2001; Martin-Padura et al., 1998; Palmeri et al., 2000]. Diese Proteine interagieren über ein Typ II PDZ-Bindemotiv mit ZO-1 und PAR-3 [Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001]. Die zweite Subgruppe enthält CAR (coxsackie and adenovirus receptor) [Bergelson et al., 1997], ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) [Hirata et al., 2001] und JAM-4 [Hirabayashi et al., 2003].

JAMs bilden homophile und heterophile Interaktionen über die extrazellulären Domänen z. B. mit Proteinen der Integrin-Familie aus [Bazzoni, 2003] und sind an der Zell-Zell-Adhäsion und dem Aufbau der Tight Junctions beteiligt [Liu et al., 2000; Palmeri et al., 2000].

1.1.2. Die Claudin-Proteinfamilie

Die ersten Claudine Cld-1 und Cld-2 wurden als integrale Transmembranproteine der TJs beschrieben und nach dem lateinischen Wort „claudere“ (schließen, abdichten) benannt [Furuse et al., 1998]. Bis heute wurden 22 weitere Mitglieder der Claudin-Familie mit einer molekularen Masse von 20-27 kDa identifiziert [Angelow et al., 2008]. Diese Tetraspan-Transmembranproteine enthalten einen kurzen cytoplasmatischen N-Terminus, einen großen und einen kleineren extrazellulären Loop mit einem dazwischen liegenden intrazellulären Loop, sowie eine cytoplasmatische C-terminale Domäne, die sich in ihrer Länge bei den einzelnen Claudinen unterscheidet. Der C-Terminus enthält ein PDZ (PSD-95/disc-large/Zonula occludens-1) -Bindemotiv, das die Bindung zu den Zonula occludens-Proteinen vermittelt [Itoh et al., 1999a]. Die hauptsächliche Funktion der Claudine ist die Regulation der Selektivität der parazellulären Permeabilität gegenüber kleinen Ionen. So erhöhen die meisten Claudine den transepithelialen Widerstand (transepithelial resistance; TER) während andere, wie z.B. Claudin-2, -10, -15 und evtl. -7 Poren bilden. Review: [Angelow et al., 2008]

1.1.3. Die Zonula occludens Proteine (ZO-Proteine)

Die Proteine ZO-1, -2 und -3 sind peripher assoziierte Membranproteine der MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) Proteinfamilie. Diese Multidomänenproteine bestehen aus drei PDZ-Domänen, einer SH3-Domäne (Src-homology-3) sowie einer Domäne mit Homologie zur Guanylatkinase (GuK), die über eine so genannte hinge-Region mit den anderen Domänen verbundenen ist [Fanning and Anderson, 2009]. ZO-Proteine bilden homo- und heteromere Proteinkomplexe und verankern Membranproteine wie Claudine, JAM und Occludin mit dem Cytoskelett. Sie funktionieren also als Gerüstprotein und konzentrieren zusätzlich viele regulatorische Proteine wie Kinasen, G-Proteine und Transkriptionsfaktoren an den TJs [Gonzalez-Mariscal et al., 2008]. Andererseits konnten für ZO-1 und ZO-2 nukleäre Funktionen im Rahmen der Regulation der Genexpression nachgewiesen werden, so dass ihnen eine typische Nacos (nuclear and adhesion complexes)-Funktion zugeschrieben werden kann [Betanzos et al., 2004; Islas et al., 2002; Kavanagh et al., 2006; Tapia et al., 2009].

Die C-terminale cytosolische Domäne von Occludin bindet an die SH3-GuK Region der ZO-Proteine [Muller et al., 2005; Schmidt et al., 2004]. Die Bindung zu Occludin spielt dabei eine kritische Rolle für den Aufbau und die Integrität der Tight Junctions.

1.1.4. Tricellulin

Tricellulin ist ein kürzlich entdecktes transmembranäres Protein der TJs mit einer molekularen Masse von ca. 63 kDa. Dieses Typ III-Transmembranprotein lokalisiert hauptsächlich in Dreizellkontakten und wurde aufgrund dieser Eigenschaft Tricellulin genannt [Ikenouchi et al., 2005]. Es enthält vier Transmembrandomänen, die zwei extrazelluläre Loops, einen intrazellulären Loop sowie eine N- und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne miteinander verbinden. Aufgrund der ähnlichen Struktur zu Occludin (besonders innerhalb der C-terminalen cytoplasmatischen Domänen) wurde vermutet, dass Tricellulin eine ähnliche Funktion besitzt und ein Funktionsverlust des einen Proteins durch das andere kompensiert werden kann. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass der Knock-down von Occludin zu einer bizellulären Lokalisation von Tricellulin an der Membran führt [Ikenouchi et al., 2008] und ein Knock-down von Tricellulin eine verringerte Lokalisation von Occludin an den bizellulären Tight Junctions und eine Desorganisation der Tight Junction Stränge zur Folge hat [Ikenouchi et al., 2005].

Über die weitere Funktion ist allerdings sehr wenig bekannt. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass Tricellulin die Barriereigenschaften der TJs wie den transepithelialen Widerstand beeinflusst [Ikenouchi et al., 2005]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Tricellulin über die C-terminale Domäne an ZO-1 bindet [Riazuiddin et al., 2006], ZO-1 aber nicht für die Translokation von Tricellulin in die Cytoplasmamembran notwendig ist [Ikenouchi et al., 2008].

1.2 Occludin

Im Jahre 1993 wurde das 504 Aminosäuren umfassende Protein Occludin als erstes integrales Membranprotein der TJs mit 4 Transmembrandomänen beschrieben [Furuse et al., 1993]. Occludin besitzt zwei extrazelluläre Loops, wobei der erste reich an Tyrosin- und Glycin-Resten, der zweite reich an Tyrosin-Resten ist. Dieses Protein ist ein integraler Bestandteil der TJs und assoziiert über die C-terminale cytoplasmatische Domäne mit den Tight Junction Proteinen ZO-1, -2 und -3 [Furuse et al., 1994; Haskins et al., 1998; Itoh et al., 1999b; Saitou et al., 2000], Cingulin [Citi et al., 1989], dem 7H6 Antigen [Zhong et al., 1993] und

Symplekin [Keon et al., 1996]. Des Weiteren konnte eine Multimerisierung von Occludin über die C-terminale coiled-coil-Domäne nachgewiesen werden [Blasig et al., 2006].

Der cytoplasmatische N-Terminus von Occludin vermittelt die Interaktion mit der E3 Ubiquitin-Protein Ligase Itch, die zur Ubiquitinierung und dem nachfolgenden proteosomalen Abbau von Occludin führt [Traweger et al., 2002]. Dabei erlaubt erst eine Phosphorylierung von Occludin an Ser490 die Interaktion mit Itch. Die Ubiquitinierung von Occludin ermöglicht es wiederum Proteinen mit Ubiquitin-Erkennungsdomänen (UIM; ubiquitin interacting motif) wie Epsin-1, Eps15 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15) und Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) an Occludin zu binden und einen Transport in Endosomen zu vermitteln [Murakami et al., 2009]. Inwiefern proteasomaler Abbau und endosomale Internalisierung konvergieren oder ob unterschiedliche Signale wie mono- oder poly-Ubiquitinierungen den weiteren Verbleib von Occludin in Recycling-Endosomen, Lysosomen oder im proteosomalen Abbauweg bestimmen, ist bisher nicht bekannt.

1.2.1. Die Funktion von Occludin

Occludin ist ein integraler Bestandteil der Tight Junctions. Dennoch ist die physiologische Bedeutung von Occludin weitgehend unbekannt. Erste Überexpressionsstudien in Sf9- und MDCK-Zellen ließen eine Funktion von Occludin bei der Ausbildung der Tight Junctions vermuten [Furuse et al., 1996; McCarthy et al., 1996]. Der Knockout von Occludin in embryonalen Stammzellen führte allerdings zu keiner Beeinträchtigung der Polarisierung epithelialer Zellen. So blieben die Morphologie und die Eigenschaften der TJs sowie die Lokalisation von ZO-1 unbeeinflusst [Saitou et al., 1998]. In Occludin-defizienten Mäusen traten ebenfalls keinerlei Veränderungen an den Tight Junctions auf. Es konnten jedoch andere Abnormalitäten im Phänotyp wie postnatale Wachstumsverzögerung, männliche Infertilität, Veränderungen der Speicheldrüse, Ca^{2+} -Ablagerungen im Gehirn und chronische Gastritis beobachtet werden [Saitou et al., 2000].

Unabhängig davon ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, dass Occludin die Barriereigenschaften der Tight Junctions, wie den transepithelialen Widerstand oder die Permeabilität gegenüber kleinen Ionen, entscheidend modulieren kann. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes und einer erhöhten Permeabilität gegenüber Mannitol führt [McCarthy et al., 2000; McCarthy et al., 1996].

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass der Knock-down von Occludin zu einer bizellulären Lokalisation von Tricellulin an der Membran führt [Ikenouchi et al., 2008]. Dies führte zu der Vermutung, dass ein Funktionsverlust von Occludin zumindest teilweise durch Tricellulin kompensiert werden kann. Zusätzlich wird über eine Funktion von Occludin bei der Signaltransduktion in diversen Signalwegen (Review: [Gonzalez-Mariscal et al., 2008]) und bei Apoptoseprozessen [Gu et al., 2008; Osanai et al., 2006] spekuliert.

1.2.2. Phosphorylierung von Occludin

Bereits 1997 wurden im Western Blot Banden nachgewiesen, die auf einen unterschiedlich starken Phosphorylierungsstatus von Occludin zurückzuführen sind [Sakakibara et al., 1997; Wong, 1997]. Da die niedermolekularen Formen (65-68 kDa) verstärkt bei besonders geringen Widerstandswerten und bei einer Störung der Tight Junctions auftreten, die hochmolekulare Form (70-75 kDa) aber bei intakten TJs nachgewiesen werden konnten, wurde spekuliert, dass die hyperphosphorylierte Form an der Formation der TJs partizipiert [Wong and Gumbiner, 1997]. Später wurde nachgewiesen, dass nach Stimulation von MDCK-Zellen mit dem Phorbol ester PMA (phorbol 12-myristate 12-acetate; aktiviert die Proteinkinase C) eine Bande bei 71 kDa auftritt, die auf Phosphorylierung an Serinresten zurückzuführen ist [Farshori and Kachar, 1999].

Inzwischen ist bekannt, dass unzählige Faktoren wie CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) [Stamatovic et al., 2006], Cytokine wie LPA (Lipophosphatidic acid) und Histamin [Hirase et al., 2001], oxidierte Phospholipide [DeMaio et al., 2006], transiente Glutamat Exposition [Andras et al., 2007], Gallensäuren [Raimondi et al., 2008] oder oxidativer Stress [Rao et al., 2002] die Phosphorylierung von Occludin an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten induzieren und auf unterschiedliche Weise die Eigenschaften von Tight Junctions beeinflussen können. Neben der Proteinkinase C wurden verschiedene Kinasen sowie die entsprechenden Signalwege hinsichtlich einer Modulation der Funktion von Occludin analysiert und identifiziert. Dazu zählen die Proteinkinase A [Beau et al., 2007; Kawedia et al., 2008; Olivera et al., 2009], c-Yes [Chen et al., 2002; Nusrat et al., 2000], src-Kinasen [Andras et al., 2007; Kale et al., 2003; Raimondi et al., 2008], Rho-Kinase (p160Rock) [Hirase et al., 2001], MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) [Andras et al., 2007; Chen et al., 2000], CaMKinase II (calcium-calmodulin-dependent protein kinase II) [Andras et al., 2007] sowie AMPK (AMP-activated protein kinase) [Zheng and Cantley, 2007]. Bisher wurden jedoch nur in einigen wenigen Fällen die Phosphorylierungsstelle(n) sowie die Auswirkungen einer Phosphorylierung auf die Funktion von Occludin im

Speziellen oder auf die Barriereigenschaften der Tight Junctions identifiziert bzw. charakterisiert.

So konnte gezeigt werden, dass VEGF (vascular endothelial growth factor), ein Signalmolekül welches an den VEGF-Rezeptor bindet und unter anderem die Angiogenese reguliert, die Phosphorylierung von Occludin an Ser490 stimuliert und dadurch dessen Bindung an ZO-1 schwächt [Sundstrom et al., 2009]. Auch Lysophosphatidylsäure (lysophosphatic acid; LPA), ein potentes Signalmolekül, welches unter anderem den Rho-Signalweg stimuliert, führt zur Phosphorylierung von Occludin und reduziert die Barrierefunktion der Tight Junctions. Über *in vitro*-Phosphorylierung von Maus-Occludin konnten die Aminosäuren Ser504 und Thr382 (Ser505 und Thr383 im humanen Occludin) als Phosphorylierungsstellen der Rho-Kinase identifiziert werden [Yamamoto et al., 2008].

Darüber hinaus konnte die Protoonkogenfamilie der Src-Kinasen als Kinase von Occludin identifiziert werden. *In vitro*-Phosphorylierung der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Occludin mit c-Src führt beispielsweise zu einer verringerten Bindung an die Proteine ZO-1, -2 und -3 [Kale et al., 2003]. In nachfolgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyr398/Tyr402 für die verringerte Bindung an ZO-1 verantwortlich ist und die Lokalisation von Occludin an den Zellkontakten sowie die Re-Assemblierung nach Ca^{2+} -Switch beeinflusst [Elias et al., 2009]. Zusätzlich wurde c-Yes, ein weiteres Mitglied der Familie der Src-Kinasen, als Interaktionspartner von Occludin beschrieben [Chen et al., 2002].

Viele Studien lassen eine komplexere Beteiligung von Serin/Threonin-Kinasen der PKC-Familie an der Phosphorylierung von Occludin vermuten. Über die Verwendung verschiedener Inhibitoren und Aktivatoren wie PMA konnte gezeigt werden, dass verschiedene Isozyme der Proteinkinasefamilie die Tight Junctions antagonistisch regulieren [Andreeva et al., 2006]. Aus *in vitro*-Studien ist darüber hinaus bekannt, dass PKC murines Occludin an Ser338 (entspricht Ser340 im humanen Occludin) bzw. PKC η die Aminosäuren Thr403/Thr404 phosphorylieren kann [Andreeva et al., 2001; Suzuki et al., 2009].

Darüber hinaus wurden inzwischen auch einige Phosphatasen identifiziert, die Occludin als Substrat erkennen können. Die Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase DEP-1 (PTP η) beispielsweise interagiert mit Occludin und ZO-1 und dephosphoryliert beide Proteine [Sallee and BurrIDGE, 2009]. Ebenso interagieren die Protein-Phosphatasen PP2A und PP1 mit der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Occludin und dephosphorylieren sie [Seth et al., 2007]. Während die PP2A an Threoninresten wirkt, dephosphoryliert PP1 hauptsächlich Serinreste.

Die Hemmung der Phosphatasen führt zu einer schnelleren Assemblierung der Tight Junctions und einem Anstieg des TER. Eine Überexpression der Phosphatasen erhöht dagegen die Permeabilität des Epithels [Nunbhakdi-Craig et al., 2002]. In Gegensatz dazu führt in pankreatischen Zellen eine reduzierte PP2A-Aktivität zu einer Hyperphosphorylierung von Occludin und einem Abfall des TER und ansteigender Permeabilität der TJs [Rajasekaran et al., 2007]. Diese Diskrepanzen sind möglicherweise auf unterschiedliche regulatorische Effekte in unterschiedlichen Zellsystemen zurückzuführen und zeigen die komplexe Rolle der Phosphorylierungen für die Funktion von Occludin.

1.2.3. Phosphorylierung von Occludin durch CKI und CKII

Die Casein Kinasen CKI und CKII repräsentieren eine einmalige Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen, die ubiquitär in allen eukaryontischen Organismen exprimiert sind.

Bis heute wurden sieben CKI Isoformen (α , β , γ_1 , γ_2 , δ und ϵ) und ihre Splice-Varianten in Säugetieren beschrieben [Dörfel and Huber, 2008]. CKI Kinasen sind monomere, konstitutiv aktive Enzyme, die die Consensussequenz D/E-X₁₋₂-S/T oder pS/pT-X₁₋₂-S/T sowie eine nicht-cannonische SLS-Sequenz erkennen können [Knippschild et al., 2005]. Dies bedeutet, dass diese Kinasen an hierarchischen Phosphorylierungsprozessen beteiligt sind, bei denen eine so genannte „Priming“-Phosphorylierung Voraussetzung für eine anschließende Phosphorylierung durch CKI ist.

CKII ist eine konstitutiv aktive Masterkinase bestehend aus zwei enzymatisch aktiven α -Untereinheiten und zwei regulatorischen β -Untereinheiten [Pinna and Allende, 2009]. Die Proteinkinase erkennt die Consensussequenz S/T-X₁₋₂-E/D und kann ATP wie GTP als Phosphat- Donor nutzen [St-Denis and Litchfield, 2009].

CKI und CKII besitzen eine wichtige Funktion bei diversen zellulären Prozessen wie der Zellteilung oder der Regulation der Genexpression. Sie beeinflussen Apoptose- und Transportprozesse und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Biorhythmus und des Wnt-Signalweges.

Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass Occludin durch diese Kinasen phosphoryliert werden kann. So konnten durch *in vitro*-Phosphorylierung von *Xenopus laevis* Occludin die Aminosäuren Thr375 und Ser379 (entspricht T404 und S408 im humanen Occludin) als potentielle CKII-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden [Cordenonsi et al., 1999]. Auch Occludin aus *Mus musculus* konnte mit CKII an den entsprechenden homologen Aminosäuren Thr403 und Ser407 phosphoryliert werden, die Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin führte zu einer deutlich verringerten Phosphorylierung [Smales et al., 2003]. Die

Phosphorylierung von Occludin durch CKI wurde ebenfalls nachgewiesen. So phosphoryliert CKIε Occludin im Bereich von AS 265-318, konkrete Phosphorylierungsstellen wurden bisher jedoch nicht identifiziert [McKenzie et al., 2006].

1.3 Zielsetzung

TJs sind Zell-Zell-Verbindungen in epithelialen und endothelialen Zellen. Sie bilden eine semipermeable Barriere für den parazellulären Transport von Ionen, Soluten und Wasser und sichern die Polarität der Zellen. Posttranslationale Modifikationen der Transmembrankomponente Occludin beeinflusst den Aufbau sowie die Organisation der TJs entscheidend. So ist aus der Literatur ist bekannt, dass Phosphorylierungen die Halblebenszeit von Occludin, die Interaktion zu den Zonula occludens Proteinen sowie die Lokalisation von Occludin direkt beeinflussen können. Diese Veränderungen betreffen direkt die Eigenschaften der TJs wie den transepithelialen Widerstand oder die Fähigkeit der Re-Assemblierung nach Calcium-Entzug.

Aus eigenen Voruntersuchungen und der Literatur war bekannt, dass CKII und CKI Occludin phosphorylieren können. Bisher ist jedoch wenig über die physiologische Bedeutung der CKII- und CKI-vermittelten Phosphorylierung von Occludin bekannt. In diesem Zusammenhang sollten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen genauer untersucht werden:

1. Interaktion der Kinasen CKII und CKI mit Occludin

- An welche Domänen von Occludin binden die Kinasen?
- Kann die Interaktion in *in vitro*-Assoziationsexperimenten und Co-Immunpräzipitationsexperimenten bestätigt werden?

2. Phosphorylierungsstellen von Occludin

- Kann humanes Occludin *in vitro* mit CKII, CKI und GSK3β phosphoryliert werden?
- Können potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden?
- Können die identifizierten Aminosäuren über ortsspezifische Mutagenese zu Alanin oder Glutamat ausgetauscht werden, um Phosphorylierungs-defiziente bzw. phosphomimikry-Konstrukte zu erstellen?

3. Einfluss der Phosphorylierungsstellen auf die Funktion von Occludin

- Beeinflusst die Mutation der Phosphorylierungsstellen die Lokalisation von Occludin?

- Ist die Bindung der Mutanten zu den Zonula occludens Proteinen ZO-1 und -2 in *in vitro*-Assoziationsexperimenten oder Co-Immunpräzipitationsexperimenten verändert?

4. Einfluss der Phosphorylierungen auf die Tight Junctions

- Können Zellen generiert werden, die die erstellten Konstrukte stabil exprimieren?
- Wenn ja, ist in diesen Zellen die Expression anderer Tight Junction Proteine wie ZO-1, -2 oder Claudin-1 und -2 verändert?
- Ist die Proliferationsrate der Zellen verändert?
- Ist die Dissoziation bzw. Re-Assemblierung der Tight Junctions nach Calcium-Entzug in diesen Zellen verändert?
- Sind die Barriereigenschaften der Tight Junctions in diesen Zellen erniedrigt bzw. erhöht?

2. Materialien

2.1 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
- Acrylamid, Rotiphorese® GEL 30, 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Adenosin-5`-triphosphat, ATP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Agar (Merck, Darmstadt)
- Agarose, ultra pure (Invitrogen, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat; APS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA)
- Bromphenolblau (SERVA, Heidelberg)
- BSA Fraktion V (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Chloroform (Roth, Karlsruhe)
- Collagen A (Biochrom AG, Berlin)
- Complete™-EDTA (Roche Applied Science, Mannheim)
- Complete™-EDTA free (Roche Applied Science, Mannheim)
- Coomassie® Brilliant Blue R250 (Merck, Darmstadt)
- DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Desoxycholsäure Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- dNTP's PCR-Grade (Roche Applied Systems, Mannheim)
- DTT (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- EDTA (Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- γ -[³²P]-ATP (spez. Aktivität > 5000 Ci/mmol) (Hartmann Analytic, Braunschweig)
- Glutathion Agarose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Glutathion, reduzierte Form (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Harnstoff (Roth, Karlsruhe)
- Imidazol (Merck, Darmstadt)
- Isopropylthiogalactosid; IPTG (AppliChem, Darmstadt)
- Kanamycindisulfat (Merck, Darmstadt)
- Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Applied Science, Mannheim)

- NAMP100V; Amplify (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Natriumfluorid (Merck, Darmstadt)
- Natriummolybdat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Natriummonovanadat (Merck, Darmstadt)
- Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)
- Nonidet P40, NP40 (Roche Applied Systems, Mannheim)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
- Polyethylenglycol; PEG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- ProTaq Mount Fluor (Biocyc GmbH&Co.KG, Luckenwalde)
- Protein-A-Sepharose™ CL-4B (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Sodiumdodecylsulfat; SDS (Merck, Darmstadt)
- TEMED (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Tris-Base (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ziegenserum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

- Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Millipore, Eschborn)
- Deckgläser (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- Dialyseschläuche, Viskin, Ausschlussgröße 10 kDa (Roth, Karlsruhe)
- Filterpapier Whatman® 3MM (Biometra, Göttingen)
- Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Mikrotiterplatten, MaxiSorbU16 Module (Nunc, Wiesbaden)
- Multiwell™-Zellkulturplatten, 6-Well (Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg)
- Objektträger (R.Langenbrinck, Emmendingen)
- PolyScreen®, PVDF (Polyvinylidenfluorid) Transfer Membrane (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Röntgenfilm, Biomax MR (Kodak, Stuttgart)
- Sterilfilter Minisart®, Porengröße 0,2 µm (Sartorius, Göttingen)
- Ultrafree®-MC Zentrifugationsfilter, 5000 NMWL (Millipore, Eschborn)

- Zellschaber (Corning Incorporated, NY, USA)

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten und Schraubdeckel-Röhrchen, Schalen für die Bakterien- und Zellkultur wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner Labortechnik (Frickenhausen) bezogen.

2.3 Molekularbiologische Materialien

2.3.1. cDNAs

Alle Occludin Konstrukte wurden über *BamHI/BamHI* kloniert. Die verwendeten cDNAs sind unten aufgeführt:

cDNA	Organismus	Typ	Modifikation	Referenz
hOccludin	<i>homo sapiens</i>	Volllänge	*	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Joachim Mankertz
hZO-2	<i>homo sapiens</i>	SH3-hinge-GuK-Region	Deletionskonstrukt	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ingolf Blasig
cZO-2	<i>canis familiaris</i>	Volllänge	-	Dr. González-Mariscal, Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Mexiko
CKI	<i>homo sapiens</i>	Volllänge	-	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andrea Hämmerlein
CKII	<i>homo sapiens</i>	Volllänge	-	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andrea Hämmerlein

*Die cDNA für Occludin wurde an zwei Stellen über ortsspezifische Mutagenese so verändert, dass die endogenen *BamHI*-Schnittstellen wegfallen. Die Aminosäuresequenz blieb davon unbeeinträchtigt.

2.3.2. Expressionsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pGEX-4T1	prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen	Amersham Biosciences, Freiburg
pMal-p2x	prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung von Maltosebindeprotein (MBP) Fusionsproteinen	New England Biolabs, Frankfurt

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pCS2+ myc ₆	eukaryontischer Expressionsvektor, CMV-Promotor; 6 × myc-Tag	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ralph Rupp, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen
p3xFLAG-CMV10	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein N-terminales 3×FLAG-Tag	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
p3xFLAG-CMV14	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein C-terminales 3×FLAG-Tag	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
pcDNA6-V5/HisB-HA	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein N-terminalen HA-Tag	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Julie Westphal (Charité, Berlin)
pGW-HA	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein N-terminalen HA-Tag	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. González-Mariscal, Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Mexiko
pQE30	prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung His ₆ -getaggtter Fusionsproteine	Qiagen, Hilden

2.3.3. Oligonukleotide und Primer

Auflistung der verwendeten Oligonukleotide und Primer (Metabion, Martinsried). In der Sequenz **fett** dargestellt ist jeweils die enthaltene *Bam*H1-Restriktionsschnittstelle, **rot** unterlegt das jeweilige Start-(ATG) bzw. Stop-Codon (TGA).

Nr.	Bezeichnung	Orientierung	Sequenz
ON645	hOcc. N-term.	forward	GCG GGA TCC ATG TCA TCC AGG CCT CTT G
ON646	hOcc. N-term. +STOP	reverse	GCG GGA TCC TTA TCC TGG AGG AGA GGT CC
ON276	hOcc. C-term	forward	GCG GGA TCC GCC GCC ATG GCT GTG AAA ACT CGA AGA AAG
ON277	hOcc. -STOP	reverse	GCG GGA TCC TGT TTT CTG TCT ATC ATA GTC TCC
ON724	hOcc. cyt aa381	forward	GCG GGA TCC GCC GCC GAC CCT GCA AAG GGA AGA GC
ON694	hOcc. N-term. -STOP	forward	GCG GGA TCC TGG AGG AGA GGT CCA TTT G
ON719	hOcc. +STOP	reverse	CGC GGA TCC CTA TGT TTT CTG TCT ATC ATA GTC
ON783	hOcc. aa389 + STOP	reverse	GCG GGA TCC CTA CCT TCC TGC TCT TCC CTT TGC
ON784	hOcc. ΔC +STOP	reverse	GCG GGA TCC TTA CTT TCT TCG AGT TTT CAC AGC
ON785	hOcc. ΔN	forward	GCG GGA TCC GCC GCC ATG ACC TCT CCT CCA GGA GTG ATT C
FLAGins	FLAG-Tag Insertion	forward	GA TCC GAT TAT AAA GAC GAT GAC GAT AAA TAG A
FLAGins	FLAG-Tag Insertion	reverse	GAT CTC TAT TTA TCG TCA TCG TCT TTA TAA TCG

Aufstellung der verwendeten Oligonukleotide für ortsspezifische Mutagenese. Die mutierten Nukleotide sind **gelb** unterlegt.

Nr.	Bezeichnung	Orientierung	Sequenz
ON810	hOcc. <i>Bam</i> HI mut pGEX	forward	GAT CTG GTT CCG CGT GGA G CC GCC GCC ATG GCT GTG AAA
ON743	hOcc. <i>Bam</i> HI mut I	forward	ACC TCT CCT CCA GGA GTG ATT CG C ATC CTG TCT ATG CTC ATT ATT
ON744	hOcc. <i>Bam</i> HI mut II	reverse	AAT GGC AAT GGC CTC CTG GGG G TC CAC AAC ACA GTA GTG ATA CGA
ON676	hOcc. S408A	forward	C TAC ACA ACT GGC GGC GAG G CC TGT GAT GAG CTG GAG GAG
ON677	hOcc. S408A	reverse	CTC CTC CAG CTC ATC ACA GG C CTC GGC GGC AGT TGT GTA
ON678	hOcc. S408E	forward	C TAC ACA ACT GGC GGC GAG GAG TGT GAT GAG CTG GAG GAG
ON679	hOcc. S408E	reverse	CTC CTC CAG CTC ATC ACA CT C CTC GCC GCC AGT TGT GTA G
ON680	hOcc. T404A/S408A	forward	C TAT GAG ACA GAC TAC ACA G CT GGC GGC GAG G CC TGT GAT
ON681	hOcc. T404A/S408A	reverse	C ATC ACA GG C CTC GCC GCC AG C TGT GTA GTC TGT CTC ATA G
ON682	hOcc. T400A/S404A	forward	GAG CAA GAT CAC TAT GAG G CA GAC TAC ACA G CT GGC GGC
ON683	hOcc. T400A/S404A	reverse	GCC GCC AG C TGT GTA GTC TG C CTC ATA GTG ATC TTG CTC
ON724	hOcc. cyt aa381	forward	GCG GGA TCC GCC GCC GAC CCT GCA AAG GGA AGA GC
ON725	hOcc. T403A/T404A	forward	CAC TAT GAG ACA GAC TAC G CA G CT GGC GGC GAG TCC TGT GAT
ON726	hOcc. T403A/T404A	reverse	CAT CAC AGG ACT CGC CGC CAG CT G C GT AGT CTG TCT CAT AGT
ON727	hOcc, T403A/T404A/S408A	forward	TAC G CA G CT GGC GGC GAG G CC TGT GAT GAG CTG GAG GAG
ON728	hOcc, T403A/T404A/S408A	reverse	CTC CTC CAG CTC ATC ACA GG C CTC GCC GCC AG C TG C GTA
ON684	hOcc. T404A	forward	C TAT GAG ACA GAC TAC ACA G CT GGC GGC GAG TCC TGT TGT GAT G
ON685	hOcc. T404A	reverse	C ATC ACA GGA CTC GCC GCC AG C TGT GTA GTC TGT CTC ATA G
ON761	hOcc. S326A/S327A	reverse	GTC ATT CAC TTT GCC ATT GG C AG C GTA TGC CAT GGG ACT GTC
ON762	hOcc. S341A	reverse	AAC CGG CGT GGA TTT ATA GG C AGA CTC TGG ATA AAA CCG
ON759	hOcc. T305A	forward	GTT AAA AAT GTG TCT GCA GGC G CA CAG GAC GTG CCT TCA CCC
ON760	hOcc. S313A	forward	GAC GTG CCT TCA CCC CCA G CT GAC TAT GTG GAA AGA GTT

Nr.	Bezeichnung	Orientierung	Sequenz
ON849	hOcc. S25A	forward	AA CCG AAT CAT TAT GCA CCA GCC AAT GAC ATA TAT GGT GGA
ON847	hOcc. S277A	reverse	C CTT GTC CCA CAA AAT ATT GGC CTT GTC ATA CCT GTC CAT
ON848	hOcc. S302A	reverse	G CAC GTC CTG TGT GCC TGC AGC CAC ATT TTT AAC CCA CTC
ON897	hOcc. T408E/T404E	reverse	CAG CTC ATC ACA CTC CTC GCC GCC CTC TGT GTA GTC TGT CTC ATA GTG ATC
ON898	hOcc. T400E/T404E	forward	AGA ACA GAG CAA GAT CAC TAT GAG GAA GAC TAC ACA GAG GGC GGC GAG

2.3.4. Bakterienstämme

Übersicht der verwendeten Bakterienstämme:

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	supE44, hsdR17, recA1, end A1, gyrA46, thi, relA1, lacF ^c [proAB ⁺ , lacI _q , lacZΔM15, Tn10 (tetr)]
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> BL21 RE4	<i>E. coli</i> BL21 mit pREP4 transfiziert

2.4 Proteinbiochemische Materialien

2.4.1. Molekulargewichtsstandards

- 1 kB Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- 100 bp Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder, SMO671 (Fermentas, St.-Leon-Rot)
- PageRuler™ Unstained Protein Ladder; SMO431 (Fermentas, St.-Leon-Rot)

2.4.2. Antikörper

Übersicht der für Western Blots (WB), Immunpräzipitation (IP) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) eingesetzten Primärantikörper und ihrer verwendeten Konzentrationen bzw. Verdünnungen:

Antikörper	Antigen	Typ	Verdünnung/ Konzentration	Referenz
anti-β-Actin	β-Actin	Maus, monoklonal	WB: 1 µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-β-Catenin	β-Catenin	Maus, monoklonal	WB: 0,5 µg/ml	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
anti-Claudin-1	Cld-1	Kaninchen, polyklonal	WB: 0,5 µg/ml	Zymed Laboratories (San Francisco, USA)
anti-Claudin-2	Cld-2	Kaninchen, polyklonal	WB: 0,5 µg/ml	Zymed Laboratories (San Francisco, USA)
anti-FLAG-M2	FLAG-Tag	Maus, monoklonal	WB: 0,5 µg/ml IP: 2 µg IF: 0,5 µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-GST	GST-Tag	Kaninchen, polyklonal	WB: 0,5 µg/ml	J. Wienands, Universität Bielefeld
anti-HA (Klon 6E2)	HA-Tag	Maus, monoklonal	WB: 1:1000 IF 1:100	Cell signaling (Danvers, MA, USA)
anti-MBP	MBP-Tag	Maus, monoklonal	WB: 0,5 µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-myc (Klon 9E10)	MYC-Tag	Maus, monoklonal	WB: 1,3 µg/ml	B. Kosel, gereinigt aus Hybridoma-ÜS
anti-Occludin	Occludin (C-term.)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1 µg/ml IF: 3 µg/ml	Zymed Laboratories (San Francisco, USA)
anti-ZO-1	ZO-1	Kaninchen, polyklonal	WB: 0,5 µg/ml IF: 0,5 µg/ml	Zymed Laboratories (San Francisco, USA)
anti-ZO-2	ZO-2	Kaninchen, polyklonal	WB: 0,5 µg/ml IF: 0,5 µg/ml	Zymed Laboratories (San Francisco, USA)

Merrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase; HRP)-konjugierte Antikörper (Sekundärantikörper):

- Anti-Maus IgG aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment; 1:10.000 Verdünnung (Dianova, Hamburg)
- Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment; 1:10.000 Verdünnung (Dianova, Hamburg)

Fluorophor-konjugierte Antikörper (Sekundärantikörper) für die Immunfluoreszenz-mikroskopie:

- Alexa Fluor™ 488 Ziege Anti-Maus IgG; 1:1.000 Verdünnung (Molecular Probes; MoBiTec, Göttingen)

- Alexa Fluor™ 594 Ziege Anti-Kaninchen IgG; 1:1.000 Verdünnung (Molecular Probes; MoBiTec, Göttingen)

2.4.3. Enzyme

- Benzonase (Merck, Darmstadt)
- cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) (New England BioLabs, Frankfurt)
- Casein Kinase I; CKI (New England BioLabs, Frankfurt)
- Casein Kinase II; CKII (New England BioLabs, Frankfurt)
- Glycogen Synthase Kinase 3β; GSK3β (New England BioLabs, Frankfurt)
- Polynukleotid Kinase; PNK (Epicentre, Madison, WC, USA)
- Pwo-DNA-Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim)
- Quick T4-DNA-Ligase (New England BioLabs, Frankfurt)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt bzw. Roche Applied Science, Mannheim)
- RNase A (Macherey-Nagel, Düren)
- Shrimp alkaline phosphatase (Roche Applied Science, Mannheim)

2.5 Zellkultur

2.5.1. Medien und Lösungen

- DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- FKS (Biochrom KG Seromed®, Berlin)
- G 418 Sulfat, Geneticin (Biochrom KG Seromed®, Berlin)
- MEM (Minimal Essential Medium Eagle) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
- SMEM (GIBCO BRL/Life Technologies., Inc., Gaithersburg, MD, USA)
- PBS Dulbecco's (0,9 mM Ca²⁺, 0,5 mM Mg²⁺) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- PBS Dulbecco's w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin 100 × (Invitrogen, Karlsruhe)
- Trypsin-EDTA; 0,25 % (Invitrogen, Karlsruhe)

2.5.2. Eukaryontische Zelllinien

- HEK-293 humane, embryonale Nierenzelle
- MDCK-C11 niederohmige Hundeenieren-Zelle (Madin-Darby canine kidney)

- HT29-B6 humane Kolonkarzinomzellen
- Caco-2 humane, kolorektale Adenomakarzinomzellen

2.6 Reaktionskits

- ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing V.1.1 Reaction Kit (Applied Biosystems/ Perkin Elmer, Weiterstadt)
- BCA-Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Weiskirchen)
- Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Applied Science, Mannheim)
- Change-IT™ Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (USB, Cleveland, Ohio, USA)
- Montagé® PCR Kit (Millipore, Eschborn)
- M30 CytoDEATH (Roche Applied Science, Mannheim)
- NucleoSEQ® Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA)
- Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Frankfurt)
- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research; Orange, USA)

2.7 Geräte

2.7.1. Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed mit GSA- und SS34-Rotoren (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Tischzentrifuge 5417C und 5417R, gekühlt (Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt (Kendro, Langenselbold)
- Vakuumzentrifuge Centrivac (Heraeus-Christ, Hanau)

2.7.2. Elektrophorese und Western Blot

- Elektrophorese-Apparatur Dual Vertical Mini Gel (C.B.S., Del Mar, CA., USA)
- Fusion-FX7 (Peqlab, Erlangen)
- Geltrockner 583 (Bio-Rad, München)
- Netzgerät Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
- Netzgerät Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter (Peqlab, Erlangen)
- Semi-Dry Transfer Cell Trans Blot SD (Bio-Rad, München)

2.7.3. Bakterien und Zellkultur

- Begasungsbrutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad (Lange, Berlin)
- Incubator Shaker C25KC (New Brunswick Scientific Edison, SJ, USA)
- Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Oberkochen)
- Konfokales Mikroskop LSM510 (Zeiss, Oberkochen)
- Mikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochen)
- Nicol LM10
- Sterile Werkbank Hera Safe HS12 (Heraeus-Christ, Hanau)
- Varioklav® Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Warmluft-Rundschüttler HT (Infors AG, Bottmingen, CH)

2.7.4. Sonstige Geräte

- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- DNA-Sequenzierer ABI Prism™ Genetic Analyzer 310 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Film-Entwicklereinheit Optimax TR (MS Laborgeräte, Heidelberg)
- Geltdrockner Model 583 (Bio-Rad, München)
- Gene Amp PCR-System 2400 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Heizblock QBT (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Luminometer Lumat LB9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- MS1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
- MultiCal® pH526 pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Multiplate Reader SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- Nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen)
- Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Ultraschallprozessor UP50H (Hielscher Ultrasonics, Teltow)
- UV-Spektrophotometer DU640 (Beckman Instruments GmbH, München)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1. PCR zur Amplifizierung von Konstrukten

Über die Polymerasekettenreaktion (polymerase-chain-reaction; PCR) können DNA-Bereiche amplifiziert und anschließend in entsprechende Zielvektoren kloniert werden.

Pipettierschema (ad 50 μ l H₂O):

5 μ l	10 \times Pwo-Puffer
1 μ l	dNTPs (10 mM)
2 μ l	Primer I (10 pmol/ μ l)
2 μ l	Primer II (10 pmol/ μ l)
0,5 μ l	DNA-Template (1 μ g/ μ l)
0,25 μ l	Pwo-DNA-Polymerase

Nach Zugabe der Pwo-DNA-Polymerase (Roche) wurde die PCR-Reaktion in einem Thermocycler Gene Amp PCR-System 2400 gestartet.

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm:

94°C	2 min	
94°C	15 s	┐
62-70°C	30 s	30 Zyklen
72°C	1-2 min	└
72°C	5 min	
15 °C	∞	

Das amplifizierte DNA Fragment wurde über das Montag  PCR Kit (Millipore) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und die DNA in 17 μ l H₂O eluiert und anschließend in einen Vektor ligiert (s. 3.1.9). Die Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert (s. 3.1.10), die Plasmid-DNA isoliert (s. 3.1.11) und durch Sequenzierung (s. 3.1.12) analysiert.

3.1.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

1 \times TBE-Puffer:: 90 mM Tris/HCl pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

6 \times DNA-Ladepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, ca. 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, ca. 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA

Die Auftrennung von DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese [Sambrook and Russel, 2001] erlaubt die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten der Größe 1-10

kb. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, einem in die DNA interkalierenden Farbstoff, lässt sich die DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 312$ nm anfärben. Je nach Größe des aufzutrennenden Fragments wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8-1 % (w/v) eingesetzt. Die aufzutrennende DNA wurde mit $6 \times$ Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine gleichzeitig aufgetragene 1 kb-Basenleiter. Das Trennergebnis wurde unter UV-Licht fotografisch dokumentiert.

3.1.3. Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Grundlage für die DNA-Isolation aus Agarosegelen ist die quantitative Bindung von DNA-Fragmenten an Silika-Partikel unter Hochsalzbedingungen und Elution unter Niedrigsalzbedingungen.

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.4. Verdau von DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen

Typ II Restriktionsendonukleasen sind Enzyme die spezifisch palindromische Sequenzbereiche von 4-8 Nukleotiden in doppelsträngigen DNA-Sequenzen erkennen und endonukleolytisch spalten.

Der Verdau mit Restriktionsenzymen wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Je nachdem, ob ein Insert aus einem Plasmid, ein Vektor oder PCR-Produkte geschnitten werden sollten, wurde der folgende Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert, das Ergebnis in einer Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.1.2) überprüft und die gewünschten Banden gegebenenfalls aus dem Gel aufgereinigt (s. 3.1.3):

Komponente	Plasmid-Insert	Vektor	PCR-Produkt
DNA	5 µg Plasmid	5 µg Vektor	17 µl (s. 3.1.1)
Restriktionsenzym	1 µl	1 µl	0,5 µl
10 × Puffer	2 µl	5 µl	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl	ad 50 µl	-

3.1.5. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung geschnittener Vektoren nach einem Restriktionsverdau (s. 3.1.4) wurde die DNA-Lösung mit H₂O auf 100 µl Volumen eingestellt, mit 100 µl Phenol versetzt und für 2 min bei $20.800 \times g$ zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 100 µl Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen und auf 100 μl Volumen mit H_2O eingestellt. Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung (s. 3.1.6)

3.1.6. Ethanolfällung von DNA

Aus wässriger Lösung kann DNA über Ethanol gefällt werden.

Je 100 μl DNA-Lösung wurden mit 10 μl Natriumacetatlösung (3 M) und 260 μl 100 % eiskaltem Ethanol versetzt, gründlich gemischt und für 30 min bei -20°C gefällt und anschließend für 20 min bei 4°C und $20.800 \times \text{g}$ zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 200 μl Ethanol (70 % (v/v); eiskalt) gewaschen und erneut für 5 min bei 4°C und $20.800 \times \text{g}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet für 20 min bei 40°C getrocknet und mit 6 μl (Ligation; s. 3.1.9) bzw. 8,5 μl (SAP; s. 3.1.8) H_2O resuspendiert.

3.1.7. Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase (Epicentre) kann synthetisierten Oligonukleotiden die fehlende 5'-Phosphatgruppen, die z. B. zur Ligation in einen Vektor nötig ist, enzymatisch angefügt werden.

Ansatz:

2 μl	10 \times PNK-Puffer
2 μl	Oligonukleotid (100 pmol/ μl)
0,8 μl	MgSO_4 (25 mM)
4 μl	ATP (10 mM)
0,5 μl	T4-PNK
ad 20 μl	H_2O

Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65°C für 10 min erhitzt (Hitzeinaktivierung).

3.1.8. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die 5'-Phosphatgruppen freier DNA-Enden können mit dem Enzym SAP (shrimp alkaline phosphatase) hydrolytisch abgespalten werden. Dies verhindert eine Religation endonukleolytisch gespaltener Vektoren und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit einer Ligation des Vektors mit der Insert-DNA, sofern diese freie 5'-Phosphatenden enthält.

Die Behandlung mit der Phosphatase wurde für 30 min bei 37°C entsprechend den Angaben des Herstellers nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

8,5 µl	Plasmid-DNA (s. 3.1.6)
1 µl	SAP
1 µl	10 × SAP-Puffer

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C und anschließend für 15 min bei 65°C.

3.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die Ligation von DNA-Fragmenten in die gewünschten Vektoren erfolgte über die T4-DNA-Ligase, ein Enzym das die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxidgruppen des Vektors mit den 5'-Phosphatgruppen des Inserts katalysiert.

Zunächst wurde die Konzentration des zu integrierenden Inserts und des Plasmids in einem Agarosegel abgeschätzt (s. 3.1.2). Anschließend wurden Insert und Plasmid in einem Verhältnis von 3:1 für die Ligation eingesetzt.

Ansatz:

ca. 600 ng	Vektor
ca. 200 ng	Insert
5 µl	2 × Ligase-Puffer
1 µl	Ligase
ad 10 µl	H ₂ O

Der Ligationsansatz wurde bei 21°C für 20 min inkubiert und das Produkt für die Transformation in *E. coli* (s. 3.1.10) eingesetzt. Die Integration und Orientierung der Fragmente in den Vektoren wurde in einem Restriktionsverdau anhand der Größe der entstehenden Fragmente überprüft.

3.1.10. Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen

LB-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl
LB-Amp-Agar:	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin
LB-Amp/Kana-Agar:	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/µl Kanamycin

Die Hitzeschock-Transformation ist die gängigste Methode zur Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen [Hanahan, 1983].

Für die Transformation von Bakterien mit der DNA aus einer Ligation (s. 3.1.9) wurde der gesamte Ligationsansatz (10µl) mit 150 µl kompetenten XL1-Blue Zellen versetzt und auf Eis für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeschockbehandlung durch Inkubation der Zellen bei 40°C für 1 min Der Transformationsansatz wurde mit 300 µl LB-Medium versetzt, für 30-45 min bei 37°C inkubiert, anschließend auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und für

12-16 h bei 37°C kultiviert. Für die Transformation von Plasmid-DNA aus Mini- oder Midi-Präparationen (s. 3.1.10) wurden 200-500 ng Plasmid in 40 µl kompetente Zellen transformiert. Die Hitzeschock-Transformation erfolgte für 1 min (XL1-Blue) bzw. 2 min für die *E. coli* Stämme BL21 (DE3), BL21 (RE4) und M15. Je 35 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.1.11. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

LB-Amp.-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl, 50 µg/ml Ampicillin
P1-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 µg/ml RNase A, 10 mM EDTA
P2-Puffer:	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
P3-Puffer:	3 M Kaliumacetat; pH 5,5
TE-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue. Mit einem Einzelklon transformierter Bakterien wurden 2 ml (Mini-) oder 75 ml (Midi-Präparation) LB-Amp-Medium angeimpft und für 16-18 Stunden bei 37°C kultiviert.

Für die Mini-Aufreinigung wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei $2.700 \times g$ für 5 min sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes wurde der Überstand quantitativ entfernt und das erhaltene Pellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl Puffer P2 wurden die Bakterien lysiert. Die anschließende Zugabe von 150 µl Puffer P3 führt zur Präzipitation von Proteinen und der genomischen DNA, die bei $20.800 \times g$ für 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde mit 900 µl Ethanol (-20°C) versetzt und die DNA durch Zentrifugation ($20.800 \times g$, 4°C, 10 min) präzipitiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei 40°C getrocknet und anschließend in 10-20 µl ddH₂O aufgenommen.

Die Aufreinigung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA (Midi-Präp.) erfolgte mit dem Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel) entsprechend den Angaben des Herstellers, die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und die enthaltene DNA-Konzentration am NanoDrop bestimmt.

3.1.12. DNA-Sequenzierung

Die Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxymethode [Sanger et al., 1992] sequenziert. Basierend auf der klassischen PCR-Reaktion werden neben den üblichen 2'-Desoxynukleotid-

Triphosphaten modifizierte, fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotid-Triphosphate verwendet. Das Fehlen der 3'-Hydroxidgruppen bei der Amplifizierung unterbindet die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen und resultiert so in Kettenabbrüchen. Durch gezielt gewählte Konzentrationen der Didesoxynukleotide kann eine statistische Verteilung der Kettenabbrüche herbeigeführt werden. Die entstehenden markierten Kettenfragmente unterschiedlicher Länge können über Kapillarelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und basenspezifisch detektiert werden.

Ansatz:

0,5 µg	Plasmid-DNA
0,5 µl	Primer (10 pmol/µl)
2 µl	5 × Sequenzierungspuffer
1,5 µl	Big Dye Terminator Mix
ddH ₂ O	ad 10 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nach dem folgenden Programm durchgeführt:

96°C	1 min	
96°C	10 s	└┘
55°C	5 s	25 Zyklen
60°C	4 min	└┘
60°C	1 s	
15 °C	∞	

Überschüssige Nukleotide wurden durch Zentrifugation über NucleoSEQ-Säulen der Firma Macherey-Nagel entsprechend den Angaben des Herstellers entfernt, das Eluat in der Speedvac eingengt und mit 20 µl Template Supression Reagent versetzt. Nach Denaturierung durch Erhitzen des Ansatzes auf 95°C für 3 min wurde die Sequenzanalyse mit dem ABI Prism™ Genetic Analyzer 310 (Perkin Elmer Applied Biosystems) durchgeführt.

3.1.13. Ortspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese erlaubt die gezielte Modifikation einer Basenabfolge und ermöglicht so die Veränderungen der Aminosäuresequenz des codierten Proteins. Sie basiert auf einer PCR-Reaktion unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide von 40-45 bp Länge. Die Oligonukleotide wurden komplementär zum entsprechenden Bereich in der DNA synthetisiert, wichen jedoch in der zu mutierenden Stelle ab.

Die Mutagenese erfolgte mit dem Change-IT™ Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (USB) entsprechend den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Oligonukleotide phosphoryliert (s. 3.1.7) und anschließend folgender PCR-Ansatz pipettiert:

2 µl	10 × Change-IT Puffer
0,5 µl	Oligo I (10 pmol/µl)
0,5 µl	Oligo II (10 pmol/µl)
1 µl	Vektor (10 ng/µl)
0,8 µl	Change-IT Enzym
ad 20 µl	H ₂ O

Der unmutierte Template-Vektor aus *E. coli* (dam⁺) ist durch methylierte und hemimethylierte Bereiche charakterisiert. Durch den Verdau mit *DpnI*, einer Endonuklease mit der Zielsequenz 5'-Gm₆ATC-3' ist ein spezifischer Abbau der Template-DNA möglich. Nach Transformation (s. 3.1.11) des Produktes in *E. coli* wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 3.1.11) und vollständig sequenziert (s. 3.1.12).

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Elektrophoresepuffer: 24,8 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,01 % (w/v) SDS

2 × SDS-Probenpuffer: 65 mM Tris/HCl, pH 6,8, 3 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycin, 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol, 4 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Pyronin G

Trenngelpuffer : 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

Die Auftrennung von Proteinen wurde unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das eingesetzte anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an Protein im Verhältnis von 1,4 zu 1 und überdeckt dabei dessen Eigenladung. Die entstehende negative Netto-Ladung auf der Oberfläche des Proteins ist proportional zur Zahl der Aminosäuren und ermöglicht so annähernd eine Auftrennung entsprechend des Molekulargewichts.

Die Auftrennung erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE nach [Laemmli, 1970] in einem vertikalen System der Firma C.B.S mit Gelen der Größe 80 × 85 × 0,75 mm. Das Sammelgel (ca. 15 mm Höhe) enthielt eine Acrylamidkonzentration von 4,5 % (w/v), die Konzentration des Trenngel (ca. 60 mm) wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine zwischen 10 und 14 % (w/v) gewählt.

Zusammensetzung des Sammel- und Trenngel für zwei 0,75 mm dicke Gele:

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	14 %	4,5 %
Trenngelp.	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelp.	-	-	-	0,5 ml
Acrylamid	2,5 ml	3,3 ml	4,7 ml	0,83 ml
H ₂ O	4,6 ml	3,77 ml	2,7 ml	1,57 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	33,3 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	33,3 µl
TEMED	13,4 µl	13,4 µl	8 µl	6,7 µl

Die aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2 × SDS-Probenpuffer verdünnt und für ca. 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60 V im Sammelgel bzw. 120 – 200 V nach Einlaufen der Lauffront in das Trenngel.

3.2.2. Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Blue R-250 Färbelösung: 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure (96 %), 40 % (v/v) Ethanol

Proteine können in Polyacrylamid-Gelen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt werden. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an Proteine und färbt diese blau. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5 µg Protein pro Bande.

Zur Färbung wurden die SDS-Gele 5-10 min bei Raumtemperatur in Färbelösung inkubiert und anschließend bis zu einem optimalen Signal/Hintergrund-Verhältnis entfärbt.

3.2.3. Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Fixierlösung: 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Inkubationslösung: 30 % (v/v) Ethanol, 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd

Silberlösung: 0,1 % (w/v) Silbernitrat, 0,01 % (v/v) Formaldehyd

Waschlösung: 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat

Entwicklerlösung: 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,01 % (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 0,05 M EDTA

Die Färbung erfolgte in einem modifizierten Protokoll nach [Klose and Kobalz, 1995].

Zunächst wurden die SDS-Gele für 5-12 h in Fixierlösung geschwenkt und anschließend für 2 h mit der Inkubationslösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit ddH₂O für 20 min

erfolgte die Inkubation mit der Silberlösung für 20 min. Die Gele wurden mit ddH₂O (30 s) sowie der Waschlösung (1 min) gewaschen und mit der Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität angefärbt. Der Stoppvorgang wurde durch Inkubation mit der Stopplösung induziert.

3.2.4. Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Anodenpuffer I:	300 mM Tris/HCl, pH 9,4
Anodenpuffer II:	30 mM Tris/HCl, pH 9,4
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 9,6, 40 mM Aminocapronsäure, 0,1 % (w/v) SDS
Blotpuffer:	48 mM Tris/HCl, 35 mM Glycin, pH 8,3

Der Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) Membran ermöglicht die Zugänglichkeit der Proteine für Antikörper und erlaubt deren immunologisch Detektion (s. 3.2.5).

Die Übertragung wurde unter Nutzung eines diskontinuierlichen Puffersystems im Semi-Dry Blotverfahren durchgeführt. Der schematische Aufbau eines Western Blot ist in Abb. 5 gezeigt.

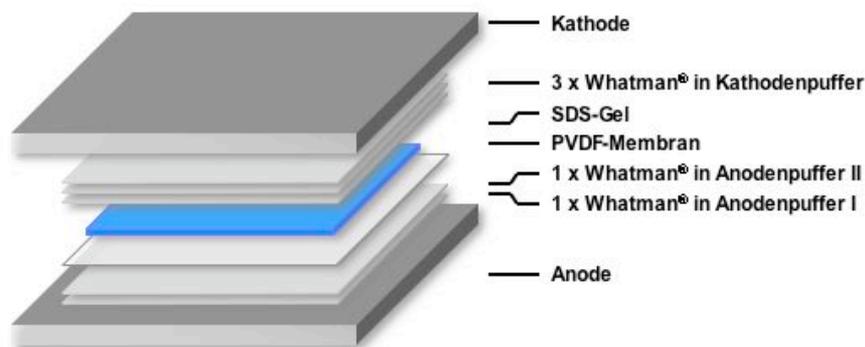


Abb. 5: Schematische Aufbau eines Western Blot. Dargestellt ist der schematische Aufbau eines Western Blot nach dem Standardverfahren. Die einzelnen Komponenten aus äquilibrierten Whatman, PVDF-Membran und Gel wurden nach dem Schichtprinzip aufgebaut.

Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 2,8 mA/cm² für 16-20 min durchgeführt. Zur Analyse von FLAG-Occludin Konstrukten und ZO-2 im Western Blot wurde dagegen ein System mit nur einem Blotpuffer verwendet. Der Aufbau erfolgte wie in Abb. 5 dargestellt, die Whatman wurden im Gegensatz dazu jedoch in Blotpuffer äquilibriert. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 70 mA/Gel für 45 min durchgeführt.

3.2.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

TST-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 % (v/v)
Tween 20

Die auf PVDF-Membranen übertragenen Proteine (s. 3.2.4) können mit einem spezifischen Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation für 30-60 min oder über Nacht bei 4°C mit 10 ml TST-Puffer abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper in TST-Puffer für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TST wurde die Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 3 × Waschen unter Benutzung des Lumi-Light Blotting Substrates (Roche Applied Science, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Lumineszenz wurde durch Exposition der Membran für 10 s bis 12 h mit einem ECL-Film dokumentiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler.

3.2.6. Proteinbestimmung: BCA-Assay

Die Proteinkonzentration einer Lösung kann über den Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) bestimmt werden. Proteine reduzieren in alkalische Lösung Cu^{2+} zu Cu^+ , das mit BCA einen violetten Farbkomplex bildet, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist und quantitativ in einer photometrischen Messung nachgewiesen werden kann [Smith et al., 1985].

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µl der zu untersuchenden Lösung mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und unter leichtem Schütteln für 40 min bei 37°C inkubiert. Parallel erfolgte die Behandlung mit einem Protein-Standard (0,02 - 1,5 mg BSA/ml). Die Absorption bei 562 nm wurde am Multiplate Reader SpectraMax 340PC gegen den entsprechenden Puffer gemessen. Die Konzentration wurde über die mit den BSA-Standards ermittelte Eichgerade berechnet.

Die Gesamtproteinkonzentration von Zelllysaten wurde, sofern möglich, am NanoDrop photometrisch gemessen.

3.2.7. Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in *E. coli*

Proteine wurden aus praktischen Gründen stets als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*, dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) aus *E.*

coli oder sechs Histidinresten (His₆-Tag) exprimiert, da dies eine affinitätschromatische Aufreinigung (s. 3.2.7.1 und 3.2.7.2) der Proteine ermöglicht.

In den benutzten Expressionssystemen inaktiviert der Lac-Repressor in Abwesenheit von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) den *tac*-Promotor der verwendeten Expressionsplasmide. Nach Zugabe von IPTG bindet dieses an den Lac-Repressor und induziert eine Konformationsänderung des Repressors. Die dadurch induzierte Dissoziation des Repressors vom Promotor führt zur Aktivierung des Promotors und resultiert in der Transkription der nachgeschalteten Gensequenzen und somit der Induktion der Expression des Fusionsproteins.

a.) Induktion der Proteinexpression

LB-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 3 % (w/v) Bacto-Yeast-Extract, 86 mM NaCl
LB-Amp:	LB-Medium, 50 μ g/ml Ampicillin
LB-Amp/Kana:	LB-Medium, 50 μ g/ml Ampicillin, 25 μ g/ μ l Kanamycin
Expressionsmedium:	LB-Medium, 1 % (w/v) Glucose, 50 μ g/ml Ampicillin / 25 μ g/ μ l Kanamycin

Zunächst wurden die entsprechenden Expressionskonstrukte in *E. coli* transformiert (s. 3.1.10) und eine Einzelkolonie in 50 ml Expressionsmedium als Vorkultur für 16-18 h bei 37°C kultiviert. Jeweils 20 ml der Vorkultur wurden in die Hauptkultur (400 ml Expressionsmedium) überführt und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-1,0 bei 37°C oder 30°C kultiviert. Die Induktion erfolgte mit 0,5–1 mM IPTG für 1–2 h bei 30°C oder 37°C im Schüttler.

Die Bakterien wurden nach der Induktion durch Zentrifugation (6.000 \times g, 15 min, bei 4°C) pelletiert, in 5 ml Lysepuffer unter Zusatz von 200 μ l Complete™-EDTA Protease Inhibitor Mix resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Für die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen wurde Complete™ Protease Inhibitor Mix ohne EDTA verwendet. Der Aufschluss erfolgte auf Eis durch Ultraschallbehandlung mit 3 \times 40 Pulsen bei einer Intensität von 40 % am Branson-Sonifier. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation mit 23.400 \times g bei 4°C für 45 min abgetrennt.

b.) Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen wurde eine Säule mit 0,8-1,2 ml Säulenvolumen unter Verwendung des unten angegebenen Säulenmaterials gegossen und mit 10 ml Lysispuffer äquilibriert. Das Bakterienlysat wurde auf die Säulen

gegeben. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und das gebundene Protein mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen mit 0,5-1,5 ml Volumen aufgefangen, jeweils 15 µl je Fraktion mit 2 × SDS-Probenpuffer versetzt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.2.1) und durch Coomassie-Färbung detektiert (s. 3.2.2). Alle Schritte der Aufreinigung wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die vereinigten, Protein enthaltenden Fraktionen wurden dialysiert (s. 3.2.8).

3.2.7.1. *GST- und MBP-getaggte Proteine*

Lysis/Wasch-Puffer: 40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0

GST-Elutionspuffer: 40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Glutathion, pH 8,0

MBP-Elutionspuffer: 40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Maltose, pH 8,0

Für die Aufreinigung von GST- bzw. MBP-Fusionsproteinen wurde Glutathion-Agarose-Beads bzw. Amylose-Beads als Säulenmaterial verwendet, die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

3.2.7.2. *His₆-getaggte Proteine (nativ)*

Lysis-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0

Wasch-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen erfolgte wie oben beschrieben unter Verwendung von Nickel-NTA-Agarose (Qiagen) als Säulenmaterial.

3.2.8. **Dialyse von Proteinlösungen**

Dialyse-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0

Die aus der affinitätschromatographischen Aufreinigung (s. 3.2.7) erhaltenen Proteinfractionen wurden dialysiert, da die für die Elution verwendeten Substanzen wie Glutathion, Maltose oder Imidazol bei nachfolgender Untersuchung stören können.

Hierfür wurden Dialyse-Schläuche mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Nach Inkubation für 24 h bei 4°C wurde der Dialysepuffer gewechselt und die Inkubation für weitere 24 h bei 4°C fortgesetzt.

3.2.9. *In vitro*-Assoziation von MBP- und GST-Fusionsproteinen (Pull-Down-Assay)

Die direkte Interaktion rekombinant erstellter Fusionsproteine (z.B.: MBP- oder GST-getaggte Proteine) lässt sich in Pull-Down-Experimenten untersuchen. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine zusammen inkubiert, um deren Assoziation zu ermöglichen. Im Ansatz enthaltenen GST-Fusionsproteine können dann über Glutathion-Agarose-Beads (GSH-Beads) gebunden und durch Zentrifugation separiert werden. An die GST-Fusionsproteine gebundene Proteine werden damit ebenfalls abgetrennt und können anschließend über spezifische Antikörper im Western Blot (s. 3.2.4-3.2.5) nachgewiesen werden.

Darüber hinaus ist es möglich durch Inkubation von rekombinant exprimierten Proteinen Interaktionspartner aus Zelllysaten zu fischen.

3.2.9.1. *Interaktion von Occludin mit CKI und CKII*

2 × Pull-Down-Puffer: 100 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 0,04 %
Triton X-100, 4 mM MgCl₂, pH 8,0

Zur Untersuchung der Interaktion von Occludin mit CKI oder CKII wurden 2 µg verschiedener GST-Occludin-Konstrukte (s. Abb. 6; GST-Occ₁₋₆₃, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ sowie GST-Occ₂₆₃₋₃₈₉ und GST-Occ₃₈₁₋₅₂₃) und 0,25 µl Kinase mit 10 mM Tris, pH 8,0 auf 100 µl aufgefüllt, mit 100 µl 2 × Pull-Down-Puffer versetzt und für 30 min bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation (20.800 × g, 5 min, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile entfernt, der Überstand mit 30 µl GSH-Beads (1:2 Suspension in 1 × Pull-Down-Puffer) versetzt und für eine weitere Stunde bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Beads wurden dreimal mit 300 µl 1 × Pull-Down-Puffer gewaschen (2.700 × g, 1 min, 4°C) und abschließend mit 40 µl 2 × SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 96°C erhitzt und pelletiert (20.800 × g, 2 min, RT).

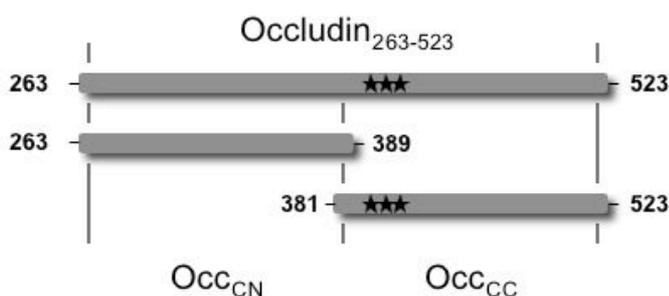


Abb. 6: Übersicht der verwendeten Deletionskonstrukte.

Dargestellt sind die generierten Deletionskonstrukte der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (AS263-523) von Occludin. Occ_{CN} umfasst den Aminosäurebereich von AS263-389, wogegen Occ_{CC} den Bereich von AS381-523 umfasst. Die mutierten Phosphorylierungsstellen T400/T404/S408 sind mit Sternchen markiert.

Die Überstände wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.2.1). Der Nachweis der Proteine erfolgte mit anti-GST- und für die Kinasen spezifischen Antikörpern in einem Western Blot (s.3.2.4-3.2.5).

3.2.9.2. *Interaktion von Occludin mit ZO-2 in MDCK-Zelllysaten*

Lysepuffer_{Rao}: PBS^{+/+}, 0,2 % /v/v) Triton X-100, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF

Für den Nachweis von Occludin in MDCK-Zelllysaten wurden 2×10^6 MDCK-Zellen/Schale ausgesät und nach 24 h mit 5 µg pGW-HA-cZO-2/Schale transfiziert (TurboFect™). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen in 500 µl Lysepuffer/Schale lysiert, die Lysate 18 × mit Ultraschall behandelt (Cycle: 0,5; Amplitude: 50; UP50H Ultraschallprozessor) gepoolt und für 15 min bei $20.800 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Für einen Ansatz wurden 400 µl Lysat mit 5 µg GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃(T400A/T404A/S408A) sowie GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃(T400E/T404E/S408E) wie unter 3.2.9.1 beschrieben inkubiert und aufgearbeitet.

Die Analyse erfolgte mit anti-GST und anti-HA Antikörpern. Die quantitative Auswertung erfolgte am Fusion-FX7 Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem und mit Hilfe von ImageJ [Rasband, 1997-2009].

3.2.9.3. *Interaktion von Occludin mit ZO-1*

1 × Pull-Down-Puffer: 10 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5

Die direkte Interaktion von Occludin mit ZO-1 wurde wie unter 3.2.9.1 beschrieben unter Verwendung von GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃(T400A/T404A/S408A) und MBP-ZO-1 (SH3-hinge-GuK) untersucht.

Um herauszufinden, ob eine Phosphorylierung von Occludin die Bindung an ZO-1 beeinflusst, wurden GST-Occludin Konstrukte an GSH-Beads gekoppelt und vor der Inkubation mit MBP-ZO-1 (SH3-hinge-GuK) mit CKII vorphosphoryliert (s. 3.2.11). Die Phosphorylierungs-defiziente Occludin Mutante T400A/T404A/S408A diente als Kontrolle.

3.2.10. **Co-Immunpräzipitation (IP)**

Die Co-Immunpräzipitation ist ein Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen in Zelllysaten. Hierbei werden vorliegende Proteinkomplexe über spezifische Antikörper isoliert und die enthaltenen Proteine in einem Western Blot detektiert.

In einen Ansatz wurden 200-800 µg Gesamtprotein eines Zelllysats mit 1-2 µg anti-FLAG-M2, anti-ZO-2 oder anti-HA Antikörper für 60 min bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert und mit 30 µl Protein-A-Sepharose versetzt. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die

Beads mit $2.700 \times g$ bei 4°C für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet dreimal mit $300 \mu\text{l}$ Lysis-Puffer (s. u.) gewaschen. Die Beads wurden mit $20 \mu\text{l}$ $2 \times$ SDS-Probenpuffer versetzt, und vorliegende Komplexe im Western Blot analysiert.

3.2.10.1. Nachweis von Occludin-Casein-Kinase-Komplexen in HEK-293-Zelllysaten

Lysispuffer A: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 300 mM Saccharose,
0,05 mM ZnCl_2 , 1-0,2 % (v/v) Triton X-100, pH 6,8

Für den Nachweis der Interaktion von Occludin mit CK I oder CKII wurden HEK-293-Zellen mit $2 \mu\text{g}$ pCS2+, pCS2+-myc₆-CKII β und pCS2+HA-CKII α , oder pCS2+-CKI ϵ sowie p3xFLAG-CMV14-Occludin transfiziert (Calciumphosphat), und die Zellen nach 48 h in Lysispuffer-A [für CKI 0,2 % und für CKII 1 % (v/v) Triton X-100] lysiert und die Immunpräzipitation wie oben beschrieben mit anti-FLAG-M2 Antikörpern durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit anti-CKI, anti-CKII bzw. anti-FLAG-M2 Antikörpern.

3.2.10.2. Nachweis von Occludin-ZO-2-Komplexen in MDCK-Zelllysaten

Lysepuffer_{Rao}: PBS^{+/+}, 0,2 % (v/v) Triton X-100, 1 mM NaVO_3 , 10 mM NaF

Für den Nachweis einer Interaktion zwischen Occludin und ZO-2 in Zelllysaten wurden 2×10^5 MDCK-Zellen/Well ausgesät und nach 24 h mit $1 \mu\text{g}$ p3xFLAG, p3xFLAG-Occludin, p3xFLAG-Occludin_{T400A/T404A/S408A} oder p3xFLAG-Occludin_{T400E/T404E/S408E} transfiziert (TurboFect™). Nach 24 h wurden die Zellen mit $200 \mu\text{l}$ Lysepuffer/Well lysiert, die Lysate $16 \times$ mit Ultraschall (Cycle: 0,5; Amplitude: 50; UP50H Ultraschallprozessor) behandelt und unlösliche Bestandteile pelletiert. Aus dem Lysat (1-1,8 mg Gesamtprotein) wurde mit $1 \mu\text{g}$ anti-ZO-2 (Kaninchen) Antikörper endogenes ZO-2 wie oben beschrieben immunpräzipitiert. Die Analyse erfolgte mit anti-ZO-2 und anti-FLAG-M2 Antikörpern. Die Chemolumineszenz wurde am Fusion-FX7 Fluoreszenzsystem gemessen und die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ [Rasband, 1997-2009].

3.2.11. In vitro-Phosphorylierung

Dialysepuffer: 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0

Kinasepuffer (CKI): 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM Dithiothreitol,
pH 7,5

Kinasepuffer (CKII): 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7,5

Kinasepuffer (GSK3 β): 20 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM Dithiothreitol,
pH 7,5

Kinasepuffer (PKA): 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7,5

Proteine können über spezifische Kinasen phosphoryliert werden. Zur Untersuchung der Phosphorylierung von Occludin wurden verschiedene GST-Occludin-Fusionsproteine (GST-Occ₁₋₆₃, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃, GST-Occ₃₈₁₋₅₂₃) rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt (s. 3.2.7). Zudem wurden die folgenden Mutationen in GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ analysiert: S277A, S302A, T305A, S313A, S326A, S327A, S341A, T400A, T403A, T404A und S408A.

Je Ansatz wurden 2 µg rekombinant exprimiertes GST-Fusionsprotein in 200 µl Dialysepuffer mit 25 µl GSH-Beads (1:2 Suspension in Dialysepuffer) versetzt und für 1 h bei 4°C im Überkopf-Schüttler vorinkubiert. Nach Zentrifugation ($2.700 \times g$, 2 min) wurden die Beads 1 × in Dialysepuffer und 1 × in Kinasepuffer gewaschen. Für die Phosphorylierung wurden 1-25 U CKI, CKII, bzw. 50 U GSK3β oder PKA (alle New England BioLabs) und 0,4 µCi [γ -³²P] ATP (6000 Ci/mmol, Hartmann Analytic) eingesetzt. Die Phosphorylierung wurde für 30 min bei 25°C durchgeführt, die GSH-Beads anschließend 4 × mit Dialysepuffer gewaschen, bei $2.700 \times g$ pelletiert und mit 25 µl 2 × SDS-Probenpuffer versetzt und die phosphorylierten Proteine auf einer SDS-SAGE aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde an einem Fuji FLA-3000 Phosphoimager gemessen und mit AIDA image analysis software ausgewertet.

Für die Untersuchung einer sequentiellen Phosphorylierung wurden 2 µg rekombinant exprimiertes GST-Protein in 200 µl Dialysepuffer mit 25 µl GSH-Beads (1:2 Suspension in Dialysepuffer) versetzt, wie oben beschrieben inkubiert und mit 0,5 mM unmarkiertem ATP und 25 U CKI phosphoryliert. Anschließend wurden die Beads 3 × mit Dialysepuffer gewaschen und gebundene Proteine mit radioaktiv markiertem ATP wie oben beschrieben phosphoryliert.

3.3 Zellkultur

3.3.1. Kultivierung von Zellen

HEK-293-Medium:	DMEM (High Glucose), 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
MDCK-Medium:	MEM, 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
HT29/B6-Medium:	DMEM (High Glucose), 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin % (v/v), 1 % (m/v) Transferrin

Adhärenz wachsenden Zellen wurden im jeweiligen Medium auf Zellkulturschalen kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und sämtliche Materialien, ausgenommen steril verpackter Einmalartikel, wurden vor der Benutzung bei 121°C in einem Autoklaven mit Wasserdampf sterilisiert.

Die Passage der Zellen erfolgte 1-2 × pro Woche. Dazu wurden die Zellen aus einer konfluent bewachsenen Kulturschale mit 2 ml Trypsin (HEK-293-Zellen mit PBS^{-/-}, 0,05 % (v/v) EDTA) abgelöst, und in einer Verdünnung von 1:2 - 1:20 neu ausgesät. Für Transfektionen oder immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. 3.3.2) und die gewünschte Zellzahl ausgesät.

3.3.2. Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl kann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Dazu wurde die Kammer mit der Zellsuspension gefüllt und vier große Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zelldichte ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = \frac{\text{Zellzahl} \times 10^4}{4 \times \text{ml}}$$

3.3.3. Einfrieren von Zellen

Gefriermedium: 10 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) FCS, 70 % (v/v) Medium

Einzufrierende Zellen wurden mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, bei 134 × g für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Gefriermedium resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und zunächst auf Stufe 3 für 30 min und anschließend für 10 min auf Stufe 10 in dem Einfriergerät Nicool LM10 im Stickstoffdampf eingefroren. Die eingefrorenen Zellen wurden bis zum weiteren Gebrauch in einem Stickstoff-Kryotank gelagert.

3.3.4. Auftauen von Zellen

In Kryo-Röhrchen eingefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit 10 ml des entsprechenden Mediums verdünnt, abzentrifugiert, in 10 ml Medium resuspendiert, auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät und bei 37°C im Brutschrank für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 × mit 10 ml PBS^{+/+} gewaschen und je nach Bedarf passagiert.

3.3.5. Transiente Transfektion von Zellen

HEK-293-Zellen wurden über die Calciumphosphat-Methode, MDCK und HT29/B6 jeweils mit Fugene[®]HD bzw. TurboFect[™] transfiziert.

3.3.5.1. Calciumphosphat-Transfektion

2 × HBS:	55 mM HEPES/NaOH, pH 7,03, 274 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
CaCl ₂ -Lösung:	2,5 M CaCl ₂

Die transiente Transfektion von HEK-293-Zellen erfolgte mit Calciumphosphat, wobei die entstehenden DNA-Co-Präzipitate auf der Oberfläche der Zellen adsorbieren und von diesen endocytotisch aufgenommen werden.

Je 1×10^6 HEK-293-Zellen/Well je 6-Well-Platte bzw. 5×10^6 HEK-293-Zellen/10 cm Schale wurden ausgesät (s. 3.3.1) und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Für einen Transfektionsansatz wurden 225 µl H₂O mit 50 µl 2,5 M CaCl₂ und der entsprechenden DNA (maximal 4 µg/Well bzw. 10 µg/Schale) versetzt und unter Vortexen tröpfchenweise zu 250 µl 2 × HBS pipettiert. Innerhalb von 20 min Inkubation bei RT bilden sich feine Präzipitate, die zu den Zellen pipettiert wurden. Nach 6-8-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurden die Präzipitate abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen und für weitere 42 h im Brutschrank kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden nach 48 h lysiert (s. 3.3.7) und auf erfolgreiche Transfektion im Western Blot (s.3.2.1-3.2.5) analysiert.

3.3.5.2. Transfektion mit Fugene[®]HD

Für eine Transfektion mit Fugene[®]HD wurden 2×10^5 MDCK C11-Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät (s. 3.3.1) und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen $1 \times$ mit 2 ml PBS^{+/+}/Well gewaschen und mit 2 ml frischem Medium versorgt.

Für einen Transfektionsansatz wurden 100 µl MEM mit 1-2 µg DNA versetzt und mit Fugene[®]HD im Verhältnis von 4:1 (Fugene[®]HD:DNA) für 20 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde anschließend auf die Zellen pipettiert.

Die transfizierten Zellen wurden nach 48 h lysiert (s. 3.3.7) und das erhaltene Lysat auf erfolgreiche Transfektion im Western Blot (s.3.2.1-3.2.5) analysiert.

3.3.5.3. Transfektion mit TurboFect[™]

Zur Transfektion mit TurboFect[™] wurden 2×10^5 bzw. 2×10^6 MDCK C11-Zellen in 6-Well-Platten bzw. 10 cm-Schalen ausgesät (s. 3.3.1), für 24 h im Brutschrank inkubiert, $1 \times$ mit 2 ml PBS^{+/+}/Well gewaschen und mit 2 ml frischem Medium versorgt. Für einen

Transfektionsansatz wurden 100 μ l (6-Well) bzw. 1 ml (10 cm-Schale) MEM mit 1-2 μ g bzw. 10 μ g DNA versetzt und mit TurboFect im Verhältnis von 1,5:1 (TurboFect™:DNA) für 20 min bei RT inkubiert.

Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h lysiert (s. 3.3.7) und auf erfolgreiche Transfektion im Western Blot (s.3.2.1-3.2.5) analysiert.

3.3.6. Stabile Transfektion von Zellen

Für eine stabile Transfektion wurden zunächst Zellen wie unter 3.3.5 beschrieben transfiziert. Nach 24 h wurden untransfizierte Zellen durch Zugabe von Selektionsmedium (Medium + 1 mg/ml G418) für 48 h eliminiert. Anschließend wurde die Konzentration des Selektionsantibiotikums sukzessive bis zu einem Wert von 0,4 mg/ml G418 reduziert. Aus den überlebenden Zellen wurden einzelne Klone gepickt und über Western Blot Analysen auf die Expression der jeweiligen Protein-Konstrukte untersucht.

Die weitere Kultivierung der selktierten Klone erfolgte in Medium + 0,4 mg/ml G418.

3.3.7. Lyse eukaryotischer Zellen

Lysis-Puffer A:	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 0,05 mM ZnCl ₂ , 0,2-1 % (v/v) Triton X-100, 1 \times Complete, pH 6,8
RIPA-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 6,8, 150 mM NaCl, 1,2 % (m/v) Natriumdeoxycholat, 1 % (v/v) Nonidet P40, 0,1 % (m/v) SDS, 5 mM EDTA, 1mM NaF, 1 mM NaMoO ₄ , NaVO ₃ . 1 \times Complete
Lysep _{RAO}	PBS ^{+/+} , 0,2 % (m/v) Triton X-100, 1 mM NaVO ₃ , 10 mM NaF, 1 \times Complete

Für die Lyse der Zellen wurde eine konfluent bewachsene 100 mm Kulturschale oder 6-Well-Platte einmal mit eiskaltem PBS^{+/+} gewaschen und anschließend mit 500 μ l Lysis-Puffer/Schale bzw. 200 μ l Lysis-Puffer/Well für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile mit 20.800 \times g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert.

Lysate, die mit RIPA-Puffer erstellt wurden, wurden vor der Zentrifugation mit 0,25 U/ μ l Benzonase für 1-2 h bei 4°C zur Entfernung der DNA verdaut. Wahlweise erfolgte zusätzlich eine Ultraschallbehandlung (4-6 Pulse; Cycle: 0,5; Amplitude: 50; UP50H Ultraschallprozessor).

3.3.8. Indirekte Immunfluoreszenz

Blocklösung: 5 % (v/v) Ziegen Serum/PBS

Fixierlösung: 100 % Methanol (eiskalt)

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) wurden zunächst 18×18 mm Deckgläschen für 1 h mit Kollagen ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) beschichtet, um eine besser Haftung der Zellen an der Oberfläche zu gewährleisten. Anschließend wurden 1×10^6 HEK-293- bzw. MDCK-Zellen/Well ausgesät und für 24 h kultiviert.

Zur Färbung der zellulären Strukturen wurden die Zellen zweimal mit $\text{PBS}^{+/+}$ gewaschen und durch Inkubation mit 2 ml 100 % Methanol (eiskalt) für 10 min bei -20°C fixiert. Durch Inkubation mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in $\text{PBS}^{+/+}$ wurden die Zellen zusätzlich permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit $\text{PBS}^{+/+}$ wurden unspezifische Bindungen für 30 min durch Inkubation der Zellen mit Blocklösung abgesättigt.

Die Zellen wurden anschließend mit in Blocklösung verdünntem Primärantikörper für 30 min inkubiert, fünfmal mit $\text{PBS}^{+/+}$ gewaschen und für 30 min bei RT unter Lichtausschluss mit dem Sekundärantikörper und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung ($0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$) zur Färbung der Zellkerne inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit $\text{PBS}^{+/+}$ wurden die Zellen mit ProTaq Mount Fluor auf Objektträgern eingebettet.

Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop LSM510 (Zeiss, Oberkochen).

3.3.9. Calcium-Switch-Experimente

LC-Medium: S-MEM, 10 % (v/v) FCS (dialysiert), 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

Medium: MEM, 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

Zur Untersuchung der Segregation bzw. Re-Assemblierung der Tight Junctions wurden Calcium-Switch-Experimente durchgeführt.

Dazu wurden 1×10^6 Zellen/Well in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h in Medium ($1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen $1 \times$ mit $\text{PBS}^{-/}$ gewaschen ($t=0$) und mit niedrig-Calcium-Medium (low calcium; LC; Ca^{2+} -Konzentration $< 5 \mu\text{M}$) inkubiert. Nach 90 min wurden die Zellen mit $\text{PBS}^{+/+}$ gewaschen und das Medium gegen normales Medium ausgetauscht ($t^*=0$). Zu bestimmten Zeiten wurden die Zellen fixiert und über Immunfluoreszenzmikroskopie (s. 3.3.8) unter Verwendung von anti-FLAG-M2 und anti-ZO-1, -2 Antikörpern analysiert.

3.3.10. Widerstandsmessungen

Der Widerstand (R^{epi}) eines Epithels - zumeist als transepithelialer Widerstand; TER gemessen - setzt sich zusammen aus dem parazellulären Widerstand (R^{para}), der durch die Barriereigenschaften der Tight Junctions bestimmt wird, dem transzellulären Widerstand (R^{trans}), der durch die apikale und die basale Zellmembran gebildet wird und dem subepithelialen Widerstand R^{sub} , der im Zellkulturmodell durch den Filtersupport verursacht wird. Der Widerstand R^{epi} lässt sich mittels Impedanzspektroskopie bestimmen.

Grundlage dieser Methode ist ein vereinfachtes Modell des Epithels als Parallelschaltkreis, bestehend aus R^{epi} sowie der epithelialen Kapazität C^{epi} , die die Kondensatoreigenschaften der basolateralen und apikalen Membranen der konfluenten Zellschicht widerspiegelt (Abb. 7).

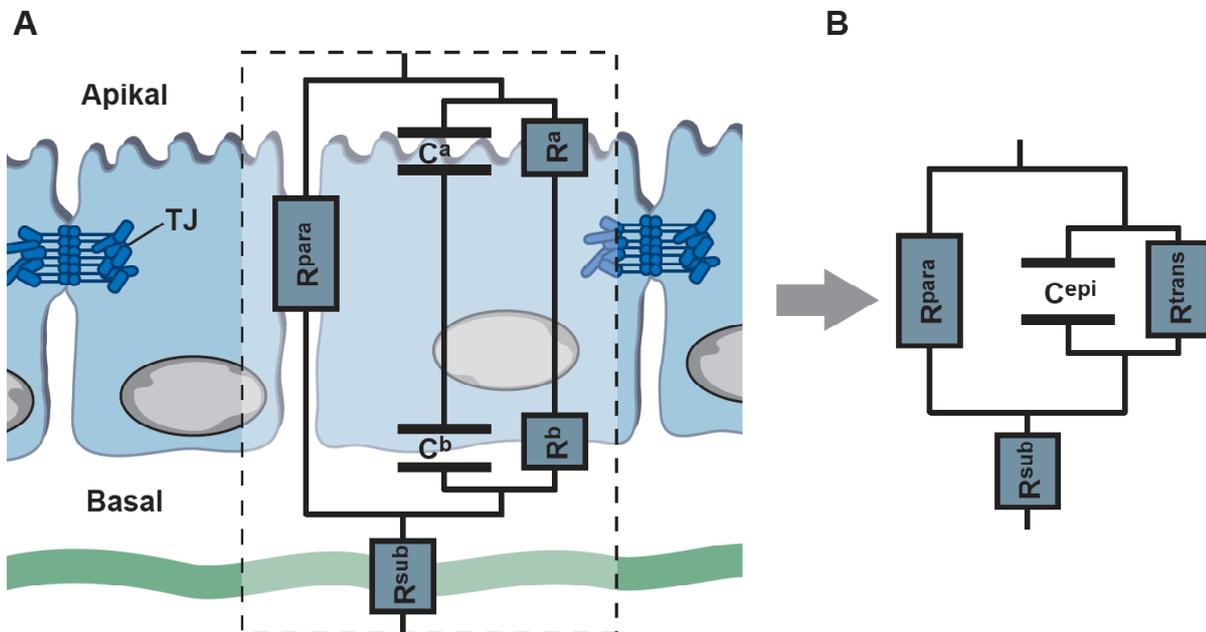


Abb. 7: Das Epithel als Schaltkreis. Vereinfachtes elektrisches Äquivalentmodell eines Epithels. Der epitheliale Widerstand (R^{epi}) setzt sich aus dem Widerstand der Tight Junctions (R^{para}), den Widerständen der apikalen und der basolateralen Zellmembran des Epithels (R^{a} und R^{b}) sowie dem subepithelialen Widerstand (R^{sub}) zusammen. Darüber hinaus wirken die apikalen und basolateralen Membranen als Kondensatoren mit der Kapazität C^{a} und C^{b} (links). Zur Vereinfachung können die apikalen und basolateralen Beiträge der Membranen in einem Parallelschaltkreis als R^{trans} und C^{epi} zusammengefasst werden (rechts).

Legt man an einem Epithel eine Wechselspannung mit einer bestimmten Frequenz an, so lässt sich die Impedanz (Wechselstromwiderstand) des Epithels anhand der Änderung der Spannung bzw. anhand der Phasenverschiebung zwischen Wechselstrom und Wechselspannung berechnen. Aus diesen Daten lassen sich R^{sub} und R^{epi} bestimmen.

Die weitere Auflösung von R^{epi} in die Bestandteile R^{trans} und R^{para} bei der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ist durch eine Erweiterung der Impedanzmessung um Flux- und

Calcium-Switch-Experimente möglich [Krug et al., 2009]. Dabei wird der parazelluläre Weg durch den Entzug von Ca^{2+} geöffnet und die Widerstandsänderung sowie der parazelluläre Flux eines geeigneten Markers, bestimmt. Dies ermöglichte die Berechnung der beiden Widerstände, da sich der parazelluläre Flux proportional zur Änderung des parazellulären Widerstandes verhält, während R^{trans} konstant bleibt.

Die Spannung der untersuchten Zellschichten wurde auf Zellfiltern bei einem Wechselstrom von $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und mit einer Frequenz von 1 Hz - 65 kHz mittels eines phasen- und frequenzsensitiven Voltage Clamp-Gerätes (FRA-402, Beran Instruments, Gilching; 1286 elektrochemisches Interface, Solartron Schlumberger, Farnborough, UK) gemessen. Die Impedanz wurde berechnet und R^{sub} und R^{epi} ermittelt. Der Calcium-Switch wurde während des Versuches durch Chelatierung von extrazellulärem Ca^{2+} mit EGTA (1,3 mM) durchgeführt. Gleichzeitig wurde der parazelluläre Flux von Fluorescein gemessen und anhand der Flux- sowie der Widerstandsänderung R^{trans} und R^{para} ermittelt.

3.3.11. Proliferationsassay

Zur Untersuchung der Proliferation der stabil transfizierten Zellen wurde das Cell Proliferation Kit II (Roche) verwendet. Diesem Kit liegt die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes XTT in einen Formazan-Farbstoff durch metabolisch aktive Zellen zugrunde (s. Abb. 8).

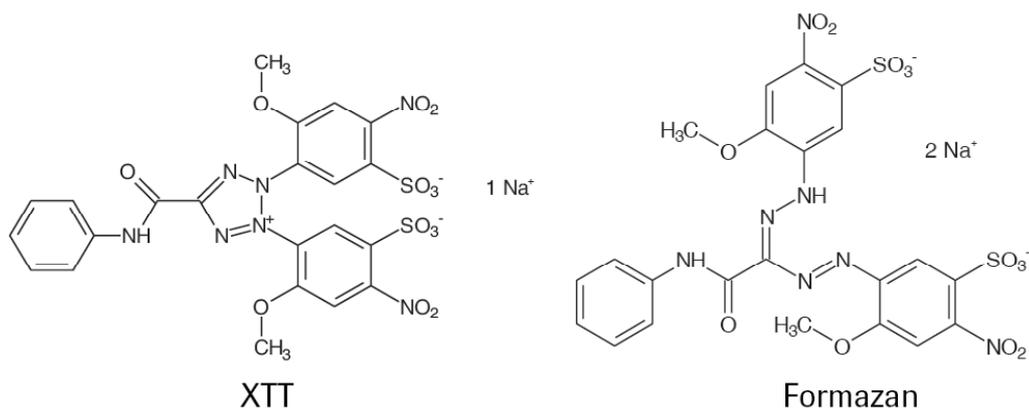


Abb. 8: Strukturformeln des verwendeten Reagenzes bzw. entstehenden Farbstoffes. Das Tetrazoliumssalz XTT wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu dem Farbstoff Formazan umgesetzt (Manual Cell Proliferation KitII)

Für eine Messung wurden $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 bzw. 5×10^4 Zellen in $100 \mu\text{l}$ Medium in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 4 Tage im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde jedes Well mit $50 \mu\text{l}$ labeling mixture (entsprechend den Angaben des Herstellers) versetzt. Die

Analyse erfolgte nach 4, 6 und 8 h bei einer Wellenlänge von 450-690 nm am Fluoreszenz-Reader.

3.3.12. MALDI

R+A-Puffer:	150 mM Tris/Cl, pH 6,8, 6 mM EDTA, 3 % (v/v) SDS, 3 % (v/v) Glycerin
TCEP-Puffer:	50 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphinchlorid
IAA-Puffer:	1 M Iodacetamid

Zur Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen von Occludin wurde die N- bzw. C-terminale Domäne von Occludin (5 µg GST- Occ₁₋₆₃ und GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃) mit 800 U CKI und 2 mM ATP bzw. γ -S-ATP als Kontrolle phosphoryliert (s. 3.2.11). Anschließend wurden die Proben mit 22 µl R+A-Puffer und 1:5 mit TCEP-Puffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben 1:20 mit IAA-Puffer versetzt und für 20 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Banden, die potentiell phosphoryliertes Occludin enthielten wurden ausgeschnitten und freundlicherweise von Dr. Andreas Schlosser über ein nanoLC-MS/MS System massenspektrometrisch analysiert [Schlosser et al., 2005].

4. Ergebnisse

4.1 Interaktion von Occludin mit Kinasen

Occludin ist ein integraler Bestandteil der Tight Junctions. Diese sehr vielseitigen Zell-Zell-Verbindungen sind hochmolekulare Proteinkomplexe bestehend aus Transmembranproteinen, die den Anker in der Zellmembran bilden und vielen cytoplasmatischen Proteinen wie den Zonula occludens Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 [Furuse et al., 1994; Haskins et al., 1998; Itoh et al., 1999b]. Darüber hinaus sind auf der cytoplasmatischen Seite zahlreiche regulatorische Proteine wie Kinasen, Phosphatasen oder G-Proteine assoziiert, die die Struktur, die Integrität sowie die Barrierefunktion der TJs beeinflussen [Gonzalez-Mariscal et al., 2008]. Daher ist es von hohem Interesse, Occludin-assoziierte Kinasen sowie die entsprechenden Phosphorylierungsstellen in Occludin zu identifizieren, um die Signalwege und die Regulationsmechanismen der TJs weiter aufklären zu können.

4.1.1. Interaktion von Occludin mit CKI und CKII

Zur Untersuchung der Interaktion von Occludin mit CKI und CKII wurden HEK-293-Zellen mit pFLAG-CMV4-Occludin und pCS2+-myc₆-CKI ϵ bzw. pCS2+-myc₆-CKII α und pCS2+-HA-CKII β co-transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Occludin-FLAG₃ mit einem α -FLAG-M2 Antikörper bzw. unspezifischem Maus-IgG präzipitiert. In den Präzipitaten konnte CKI ϵ -myc₆ nachgewiesen werden, sofern pFLAG-CMV4-Occludin und pCS2+-myc₆-CKI ϵ zusammen transfiziert worden waren (Abb. 9A, Spur 3). Wurde jeweils nur pFLAG-CMV4-Occludin oder pCS2+-myc₆-CKI ϵ alleine transfiziert, so ließ sich CKI ϵ -myc₆ nicht im Western Blot nachweisen. Die Immunpräzipitation mit IgG (Spur 4) diene als Kontrolle. Auch hier war kein Signal für CKI ϵ -myc₆ detektierbar.

In vergleichbaren Untersuchungen mit CKII konnte eine Co-Immunpräzipitation ebenfalls lediglich in Lysaten nachgewiesen werden, die mit pFLAG-CMV4-Occludin, pCS2+-myc₆-CKII α und pCS2+-HA-CKII β transfiziert worden waren (Abb. 9B, Spur 3). Dies spricht für eine Interaktion von Occludin mit CKI und CKII.

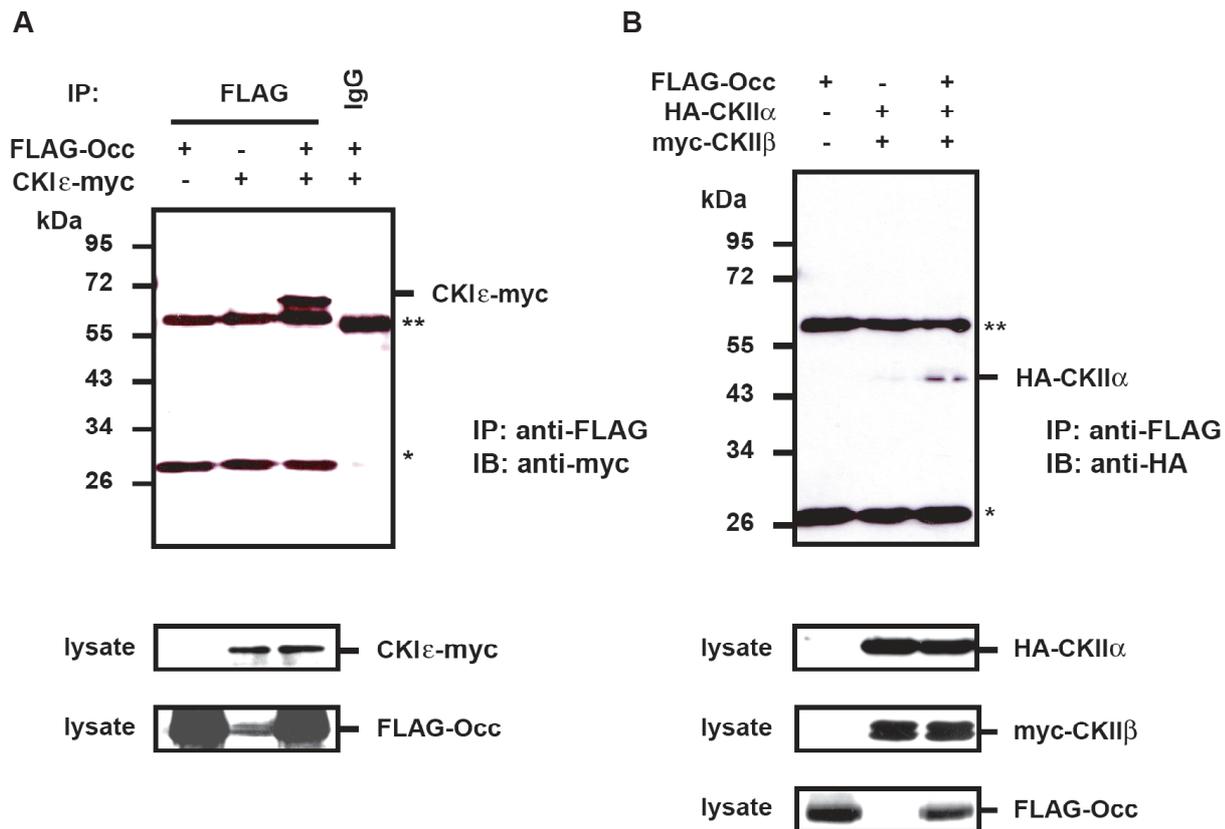


Abb. 9: Interaktion von Occludin mit CKI und CKII. HEK-293-Zellen wurden transient mit pFLAG-CMV4-Occludin sowie pCS2+myc₆-CKI ϵ oder pCS2+HA-CKII α und pCS2+myc₆-CKII β transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit einem α -FLAG-M2 Antikörper bzw. IgG durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem α -MYC bzw. α -HA Antikörper (oben). Die Transfektionskontrollen sind unten dargestellt. **A)** Western Blot zum Nachweis der Interaktion von Occludin mit CKI **B)** Detektion der Interaktion von Occludin mit CKII. *leichte Kette **schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers.

4.1.2. Direkte Interaktion von Occludin mit CKI und CKII

Da die Untersuchungen in Zelllysaten durchgeführt wurden, lässt sich anhand dieser Ergebnisse keine Aussage treffen, ob es sich bei der Wechselwirkung um eine direkte Interaktion der Kinasen mit Occludin handelt, oder ob Gerüstproteine die Interaktion vermitteln. Die direkte Interaktion zweier Proteine lässt sich dagegen in *in vitro*-Assoziationsexperimenten (Pull-Down) nachweisen.

Dazu wurden die N-terminale (Occ₁₋₆₃) bzw. die C-terminale Domäne von Occludin (Occ₂₆₃₋₅₃₂) sowie zwei deletierte Konstrukte des C-terminalen cytoplasmatischen Teils (distale Domäne: Occ₂₆₃₋₃₈₉ und proximale Domäne: Occ₃₈₁₋₅₂₃) in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T1 kloniert, als GST-Fusionsprotein exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die erhaltenen GST-Proteine wurden an GSH-Beads gekoppelt und in Pull-Down-Experimenten mit CKI δ und CKII hinsichtlich einer möglichen Interaktion untersucht.

In Abb. 10A ist exemplarisch ein Western Blot der Untersuchung für CKI δ gezeigt. CKI δ assoziiert mit der C-terminalen (GST-Occ₂₆₃₋₃₈₉), nicht aber mit der N-terminalen (GST-Occ₁₋₆₃) Domäne von Occludin. Der GST-Blot (Abb. 10B) zeigt, dass vergleichbare Mengen der jeweiligen Fusionsproteine für die Untersuchungen eingesetzt wurden.

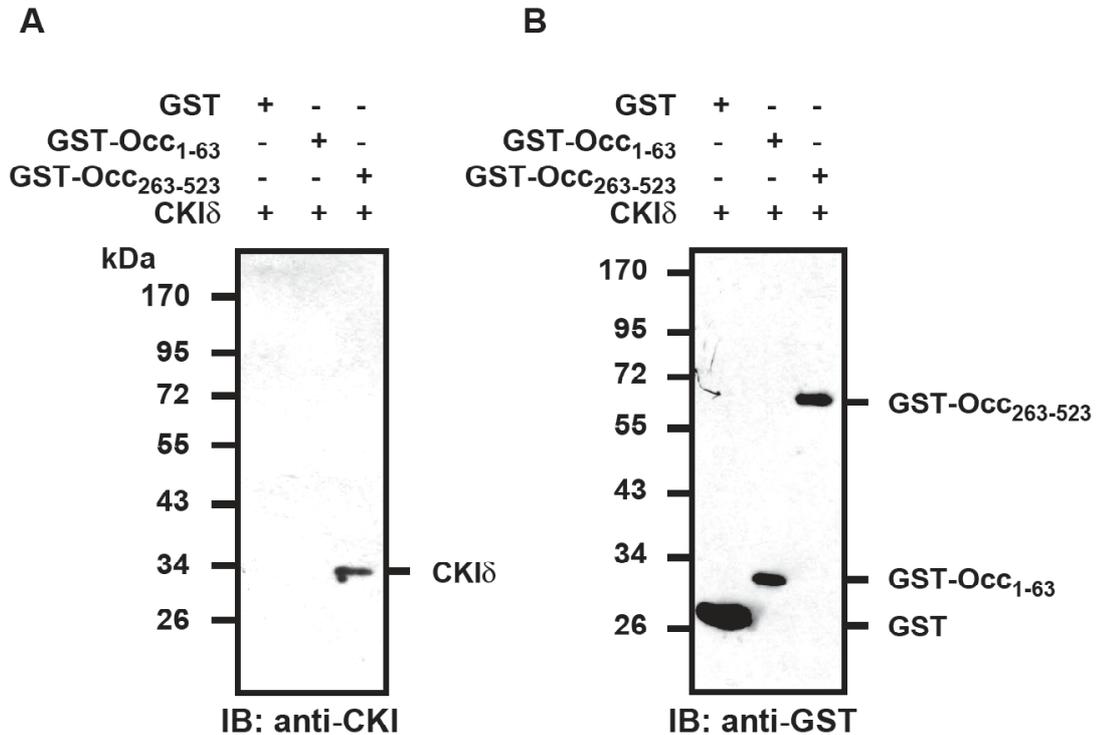
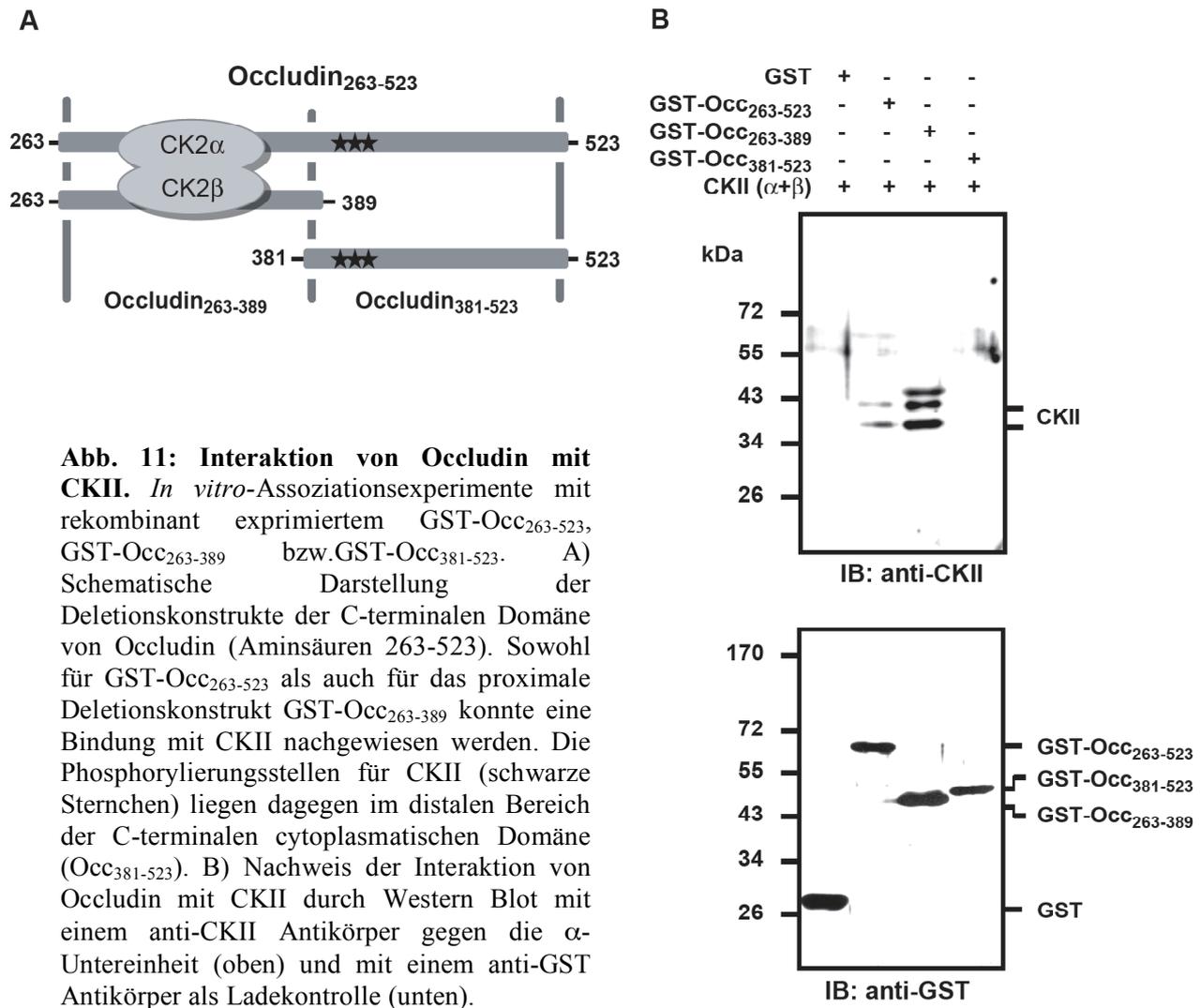


Abb. 10: Direkte Interaktion von Occludin und CKI. *In vitro*-Assoziationsexperimente mit rekombinant exprimiertem GST-Occ₁₋₆₃ und GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃. Western Blot zum Nachweis der Interaktion von Occludin mit CKI δ (A) und Input-Kontrolle (B).

Sowohl GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ als auch die C-terminal deletierte Variante GST-Occ₂₆₃₋₃₈₉ (distal) zeigte eine Bindung an CKII (Abb. 11A). GST-Occ₃₈₁₋₅₂₃ (proximal) interagiert allerdings ebenso wenig mit CKII wie GST alleine. Eine Übersicht der verwendeten Deletionskonstrukte ist in Abb. 11B dargestellt. Die Bindungsdomäne für CKII liegt im Bereich der Aminosäuren 263-523, während potentielle CKII-Phosphorylierungsstellen weiter C-terminal liegen (s. u.).



4.2 Phosphorylierung von Occludin

Aufgrund der Interaktion von Occludin mit CKI und CKII war eine Phosphorylierung des Proteins durch diese Kinasen wahrscheinlich. Zur Untersuchung ob humanes Occludin tatsächlich als Substrat für die Kinasen CKI, und CKII dienen kann, wurden *in vitro*-Kinasierungsexperimente mit radioaktiv markiertem γ -P³²-ATP und GST-Fusionsproteinen der N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen von Occludin durchgeführt. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurde überschüssiges ATP von, den an GSH-Beads gebundenen, GST-Fusionsproteinen gewaschen und anschließend die phosphorylierten Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. In diesen Experimenten zeigte sich, dass CKI δ sowohl die N- als auch die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Occludin (GST-Occ₁₋₆₃ bzw. GST-

Occ₂₆₃₋₅₂₃) phosphoryliert. Im Gegensatz dazu phosphoryliert CKII lediglich die C-terminale Domäne (Abb. 12).

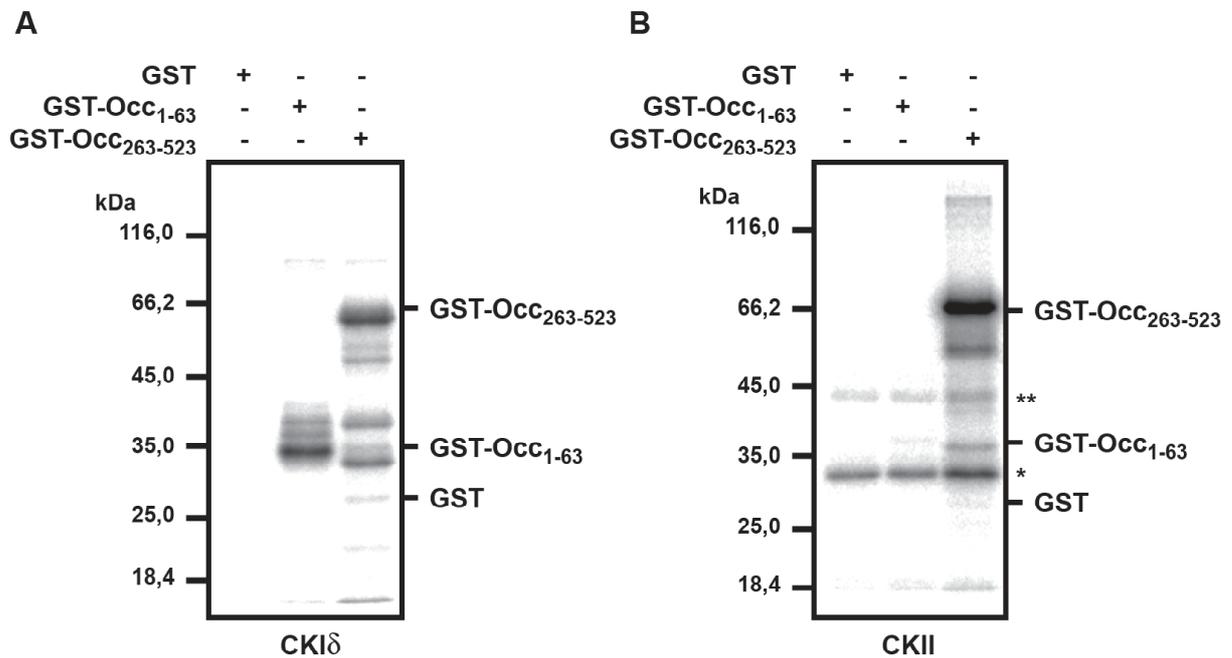


Abb. 12: Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domänen von Occludin. GST-Fusionsproteine der N- und C-terminalen Domänen von Occludin wurden *in vitro* mit gereinigter CKIδ (A) oder CKII (B) phosphoryliert und nach SDS-PAGE durch Autoradiographie analysiert. GST alleine wurde nicht phosphoryliert. Autophosphorylierung der α- (**) bzw. β-Untereinheit (*) von CKII.

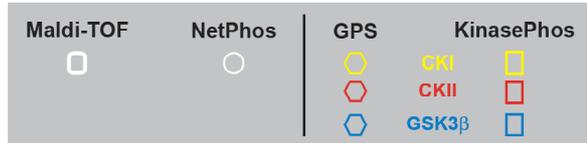
4.2.1. Identifizierung von CKI-Phosphorylierungsstellen

Zur Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen von CKIδ in Occludin wurden die N- und C-terminalen Domänen *in vitro* mit CKIδ phosphoryliert und die Proteine anschließend mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Banden der phosphorylierten Proteine (erkennbar an einem höheren Molekulargewicht in der SDS-PAGE; s. Abb. 13A) wurden ausgeschnitten und hinsichtlich potentieller Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von MALDI/TOF in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Schlosser analysiert. Darüber hinaus wurde die Aminosäuresequenz von Occludin mit den Programmen NetPhos 2.0 [Blom et al., 1999], GPS [Xue et al., 2008] und KinasePhos [Huang et al., 2005] auf charakteristische Erkennungssequenzen der betreffenden Kinasen untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 13B dargestellt.

A

```

. 1  MSSRPLESPPPYRPDEFKPNHYAEFNDIMGGEMHVRPMLSQPAYCFYPEDEILHFYKWTSPPGVIRILSMLIIVMCIAIF
. 80  ACVASTLAWDRGYGTSLLGGSVGYPGSGFGSGYSGYGYGYGYGYGYYTDPRAAKGFMLAMAACFCIAALVIFVTSV
.160  IRGEMSRTRRYLSVIIVSAILGIMVFIATIVYIMGVNPTAGSGSGLYGSQIYALCNQFYTPAATGLYVDQYLYHYCVVD
.240  PQEAIAIVLGFMIIVAFALIIFFAVKTRRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQPPNVEEWVKNVSGAGIIDDVFSPIIDYVERVD
.320  SPMAYSSNGKVNDRFYPEKIKYKSTPVPEVVQELPLKIDPVDVDFRQPRNSGNGNFETFKRAPAKGRAGRSKRTEQDHYET
.400  DYTGGTSCDELEEDWIREYPPCTSDQQRQLYKRNFDTGLQBYKSLGSELDEINKEISRLDKELDDYREKGEYMAAADE
.480  YNRLKQVKGSDADYKSKKNHCKQLKSKLISHIKKMGVDYDRQKT
    
```



B

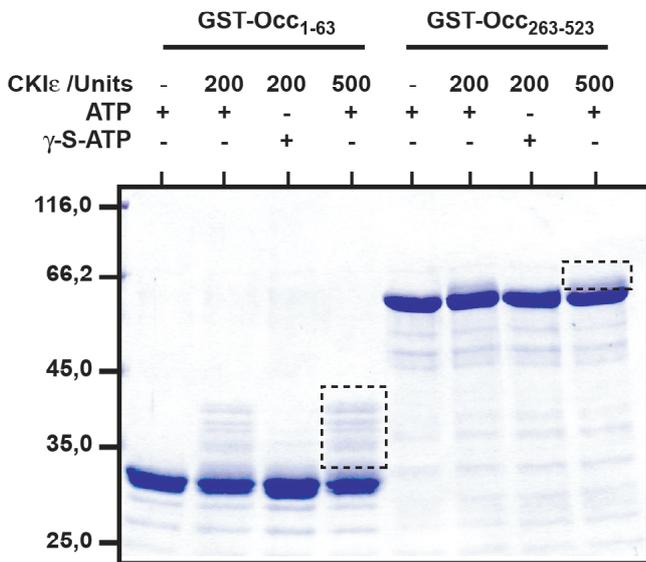


Abb. 13: Identifizierung potentieller CKI-Phosphorylierungsstellen.

Zur Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen von Occludin wurden die N- bzw. C-terminale Domäne von Occludin (GST-Occ₁₋₆₃ bzw. GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃) mit CKIδ *in vitro* phosphoryliert und anschließend mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. A) Sequenzanalyse von Occludin. Die schwarz unterlegten Bereiche in der Sequenz entsprechen den N- bzw. C-terminalen Domänen, die weiß markierten Aminosäuren wurden über MALDI/TOF als potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert. Über Sequenzanalyse-

programme identifizierte potentielle Phosphorylierungsstellen sind farbig unterlegt. A) Coomassie-Färbung eines SDS-Gels nach Phosphorylierung mit CKIδ. γ-S-ATP wurde als Negativkontrolle verwendet. Die höhermolekularen Banden (siehe Kästchen) wurden ausgeschnitten und über MALDI/TOF analysiert.

Die als potentielle Phosphorylierungsstellen identifizierte Serin- und Threoninreste wurden anschließend über ortsspezifische Mutagenese zu Alanin mutiert (S25A, S277A, S302A, T305A, S313A, S326A, S327A, S341A, T403A). Dabei wurden teilweise Doppel- und Tripelmutationen erzeugt. Die erstellten Konstrukte wurden anschließend einer *in vitro* Phosphorylierungen unterzogen um zu untersuchen, ob durch die eingeführten Mutationen der Phosphorylierungsgrad von Occludin verändert wurde. Ein exemplarisches Experiment ist in Abb. 14 dargestellt.

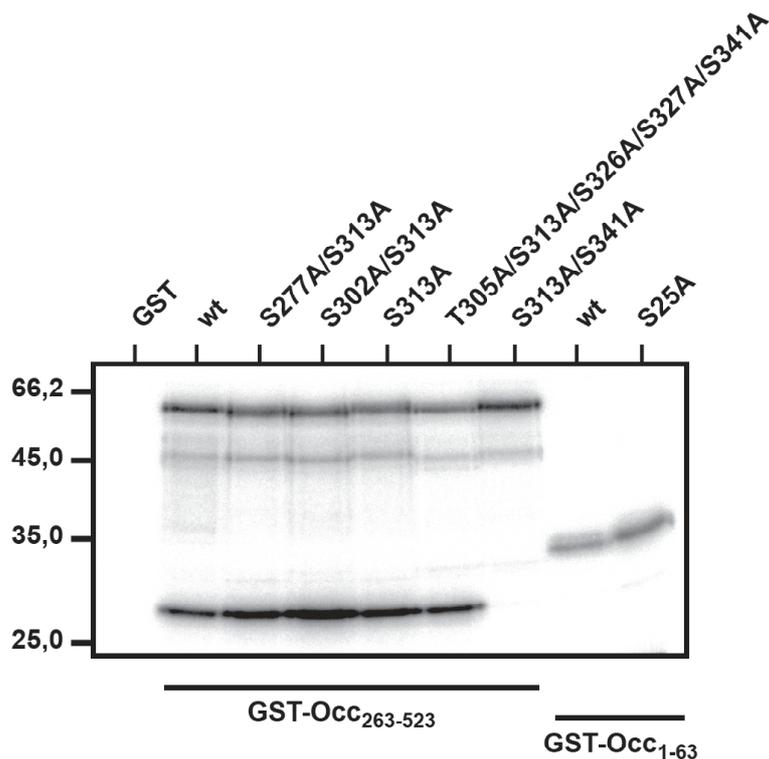


Abb. 14: Analyse der erstellten Occludin-Mutanten hinsichtlich ihrer Phosphorylierung durch CKI δ . Autoradiogramm der verschiedenen GST-Occludin-Mutanten nach *in vitro* Phosphorylierung mit CKI δ . Die Konstrukte unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrem Phosphorylierungsgrad.

Wie dem Autoradiogramm zu entnehmen ist, zeigen alle eingesetzten Occludin-Konstrukte einen annähernd vergleichbaren Phosphorylierungsgrad nach Kinasierung mit CKI δ .

4.2.2. Identifizierung von CKII-Phosphorylierungsstellen in Occludin

Ausgehend von der Beobachtung, dass durch CKII die C-terminale Domäne von Occludin phosphoryliert wird (s. Abb. 12), sollten im Folgenden die entsprechenden Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aminosäuren T375/S379 (*Xenopus laevis*) bzw. T403/S407 (*Mus musculus*) als potentielle CKII-Phosphorylierungsstellen dienen können [Cordenonsi et al., 1997; Cordenonsi et al., 1999; Smales et al., 2003]. Allerdings konnte die funktionelle Bedeutung der CKII-abhängigen Phosphorylierung von Occludin bisher nicht aufgeklärt werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass weitere, bisher unidentifizierte, Phosphorylierungsstellen für CKII vorliegen.

Daher wurden in einem ersten Schritt die zu *Xenopus* und Maus homologen Aminosäurereste Ser408 und Thr404 in Occludin zu Alanin mutiert (Abb. 15A). Dabei zeigte sich, dass durch sequentielle Mutation der beiden Aminosäurereste der Phosphorylierungsgrad immer weiter reduziert wurde. Dennoch war auch in dem S408A/T404A-Konstrukt eine Restphosphorylierung detektierbar (Abb. 15B).

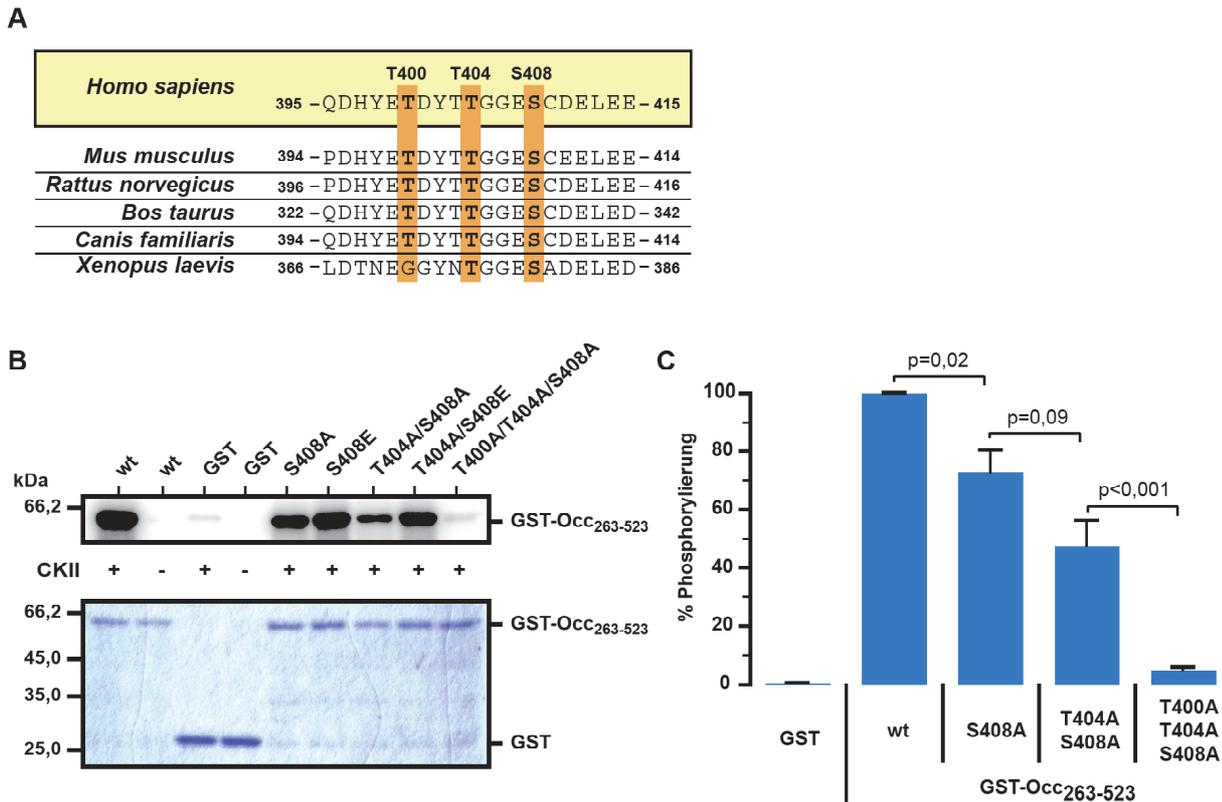


Abb. 15: Phosphorylierung von Occludin durch CKII. **A)** Sequenzvergleich von Occludin aus unterschiedlichen Spezies. Die homologen Serine bzw. Threonine T400, T404 und S408 wurden farblich unterlegt. **B)** GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ (wt, S408A, S408E, T404A/S408A, T404A/S408E, T400A/T404A/S408A und T400A/T404A/S408A) wurde *in vitro* mit CKII phosphoryliert. Autoradiogramm der Phosphorylierung (oben) sowie Coomassiefärbung des SDS-Gels (unten). **C)** Quantifizierung der Phosphorylierung der Alanin-Mutanten im Vergleich zum C-Terminus von Wildtyp-Occludin. Die dargestellten Werte (Mittelwert und Standardfehler) wurden in 4 unabhängigen Phosphorylierungsexperimenten ermittelt.

In einem weiteren Ansatz wurde ein Austausch der Aminosäure Ser408 zu Glutamat (S408E) durchgeführt. Durch die Einführung von Glutamat oder Aspartat wird eine negative Ladung eingeführt, die eine Phosphorylierung imitiert (Abb. 16).

Die E-Mutanten wiesen deutlich stärkere Signale auf als ihre entsprechenden A-Mutanten. Dies deutet auf eine kooperative Phosphorylierung hin, d. h. die Phosphorylierung einer Aminosäure erleichtert die weitere Phosphorylierung der umliegenden Aminosäuren durch CKII. Aufgrund der möglichen Kooperativität und aufgrund von Sequenzanalysen war das benachbarte Thr400 ein weiterer Kandidat für eine Phosphorylierung durch CKII. Erst nach zusätzlicher Mutagenese dieser Aminosäure konnte keine Phosphorylierung mehr durch CKII detektiert werden (Abb. 15). Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten von Occludin nach Kinisierung mit CKII verdeutlicht die stufenweise Reduktion der Phosphorylierung bei Mutation von einer, zwei bzw. aller drei CKII-Phosphorylierungsstellen (Abb. 15C).

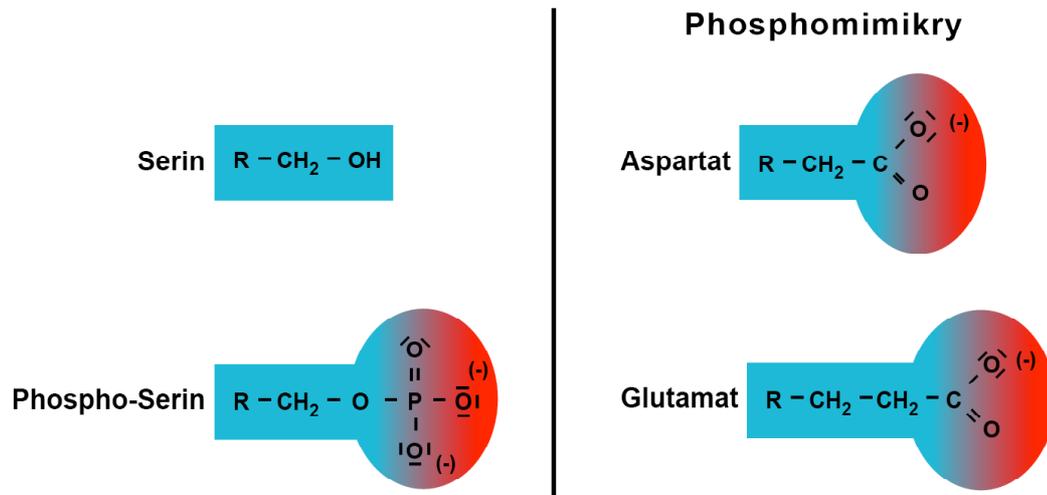


Abb. 16: Phosphomimikry. Dargestellt sind die Seitenketten der Aminosäuren Serin, Phosphoserin, Aspartat und Glutamat. Die Phosphorylierung einer Hydroxylgruppe an einem Serinrest führt zu einer Anhäufung negativer Ladungen (links). Aufgrund der ähnlichen Struktur (s. rechts) hat der Austausch eines Serins zu Glutamat einen ähnlichen Effekt und täuscht eine konstante Phosphorylierung vor. In diesem Fall spricht man von Phosphomimikry.

4.2.3. Serielle Phosphorylierung durch GSK3 β

Die Glycogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist. Sie phosphoryliert häufig Sequenzmotive, bei denen ein Serin oder Threonin-Rest durch drei Aminosäuren getrennt vorliegt (S/T-X-X-X-S/T). Dabei ist oft eine Vorphosphorylierung des C-terminalen Ser/Thr dieses Sequenzmotivs notwendig. Beispielsweise kann GSK3 β die Aminosäuren T41, S37 und S33 von β -Catenin, einer zentralen Komponente des Wnt-Signalweges, phosphorylieren. Die Voraussetzung dafür ist, dass β -Catenin an S45 vorphosphoryliert vorliegt. Diese sogenannte „priming“ Phosphorylierung an S45 wird durch CKI vermittelt und führt letztendlich zur Ubiquitinierung und dem anschließenden proteasomalen Abbau von β -Catenin [Liu et al., 2002].

Die oben identifizierten Aminosäuren in Occludin entsprechen einem typischen GSK3 β -Motiv (T400-X-X-X-T404-X-X-X-S408). Daher sollte untersucht werden, ob dieses Sequenzmotiv auch durch GSK3 β genutzt werden kann. Zunächst wurde überprüft, ob die C-terminale Domäne von Occludin (AS263-523) durch GSK3 β unabhängig von einer Vorphosphorylierung phosphoryliert werden kann. Dazu wurden GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ Wildtyp und die unter 4.2.2 erwähnten Phosphorylierungs-Mutanten *in vitro* mit GSK3 β phosphoryliert, anschließend mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert (Abb. 17A). GST-Occludin₂₆₃₋₅₂₃ konnte dabei durch GSK3 β phosphoryliert werden. Jedoch war das

Phosphorylierungssignal wesentlich schwächer im Vergleich zu den Untersuchungen mit CKI und CKII. Die eingesetzten Mutanten zeigten ebenfalls ein Phosphorylierungssignal, wobei der Phosphorylierungsgrad der T404A-Mutanten im Vergleich zu den unmutierten T404-Konstrukten reduziert zu sein scheint. Dies deutet darauf hin, dass T404 möglicherweise von GSK3 β phosphoryliert wird. In Abwesenheit von GSK3 β (Kontrolle) konnte keine Phosphorylierung festgestellt werden.

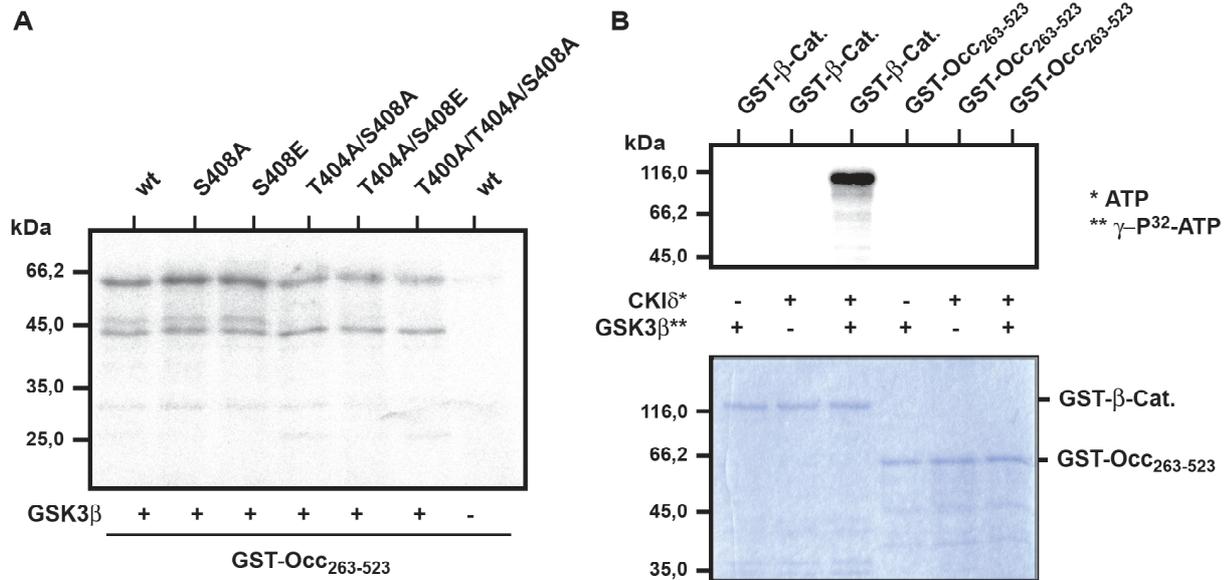


Abb. 17: *In vitro* Phosphorylierung von Occludin durch GSK3 β . Autoradiogramm bzw. Coomassiefärbung der Phosphorylierung von Occludin mit GSK3 β . **A)** *In vitro*-Phosphorylierung von GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ (wt, S408A, S408E, sowie der Doppel- und Tripelmutanten mit T404A und T400A) mit 50 U GSK3 β für 30 min **B)** GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ und β -Catenin (Kontrolle) wurden mit kaltem ATP und CKI δ vorphosphoryliert. Nach einem Waschschritt wurden die Proteine mit 25 U GSK3 β in Gegenwart von γ -P³²-ATP für 20 min phosphoryliert.

Zur Untersuchung, ob eine Phosphorylierung von Occludin durch CKI, ähnlich wie bei β -Catenin, ein Initiationssignal für eine sequentielle GSK3 β -Phosphorylierung darstellt, wurde GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ in Anwesenheit von ATP mit CKI δ für 30 min vorphosphoryliert. Anschließend erfolgte die Phosphorylierung mit 25 U GSK3 β für 30 min und radioaktiv markiertem ATP. Als Positivkontrolle wurde GST- β -Catenin verwendet.

Wie in Abb. 17B zu sehen ist, lässt sich eine Phosphorylierung von GST- β -Catenin durch GSK3 β erst nachweisen, wenn GST- β -Catenin durch CKI vorphosphoryliert wurde (Spur 1-3). Für GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ war in diesem experimentellen Ansatz keine Phosphorylierung durch GSK3 β nachweisbar. Selbst nach Vorphosphorylierung von GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ durch CKI konnte keine Phosphorylierung durch GSK3 β nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass keine sequentielle Phosphorylierung stattfindet. Um zu untersuchen, ob eine

Vorphosphorylierung von CKII eine weitere Phosphorylierung von Occludin durch GSK3 β begünstigt, wurden serielle Phosphorylierungsexperimente, wie für CKI beschrieben, durchgeführt. Allerdings ließ sich dabei ebenfalls keine Kooperativität feststellen (Daten nicht gezeigt).

4.3 CKII-abhängige Interaktion von Occludin mit ZO-1 und -2

Aus der Literatur ist bekannt, dass Phosphorylierungen die Interaktionen verschiedener Proteine beeinflussen können. So wurde z.B. gezeigt, dass eine Phosphorylierung von Occludin an Ser490 nach Stimulation mit VEGF die Interaktion von Occludin mit der E3-Ubiquitin-Ligase Itch ermöglicht. Dies führt letztendlich zur Ubiquitinierung und Endocytose von Occludin [Murakami et al., 2009]. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Phosphorylierung von Occludin durch c-Src die Interaktion von Occludin mit den Zonula occludens Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 stark beeinträchtigt [Kale et al., 2003]. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen Tyr389 und Tyr402 [Elias et al., 2009] liegen in unmittelbarer Nähe zu den hier identifizierten CKII Phosphorylierungsstellen.

Daher war es das Ziel, festzustellen, ob eine mögliche CKII-abhängige Modulation der Interaktion von Occludin und ZO-2 vorliegt. Dazu wurden Pull-Down-Experimente sowie Immunpräzipitationsexperimente mit Wildtyp-Occludin sowie der CKII Phosphorylierungsdefizienten Mutante T400A/T404A/S408A und der Phosphomimikry-Mutante T400E/T404E/S408E durchgeführt.

4.3.1. Direkte Interaktion von Occludin und ZO-1

Zur Untersuchung der direkten Interaktion von Occludin und ZO-1 wurden GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ und GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A sowie ein ZO-1-Konstrukt, welches die Occludin-bindende Domäne enthält (MBP-ZO-1-SH3-hGuK; [Schmidt et al., 2004]), rekombinant exprimiert und im Pull-Down auf eine Interaktion untersucht.

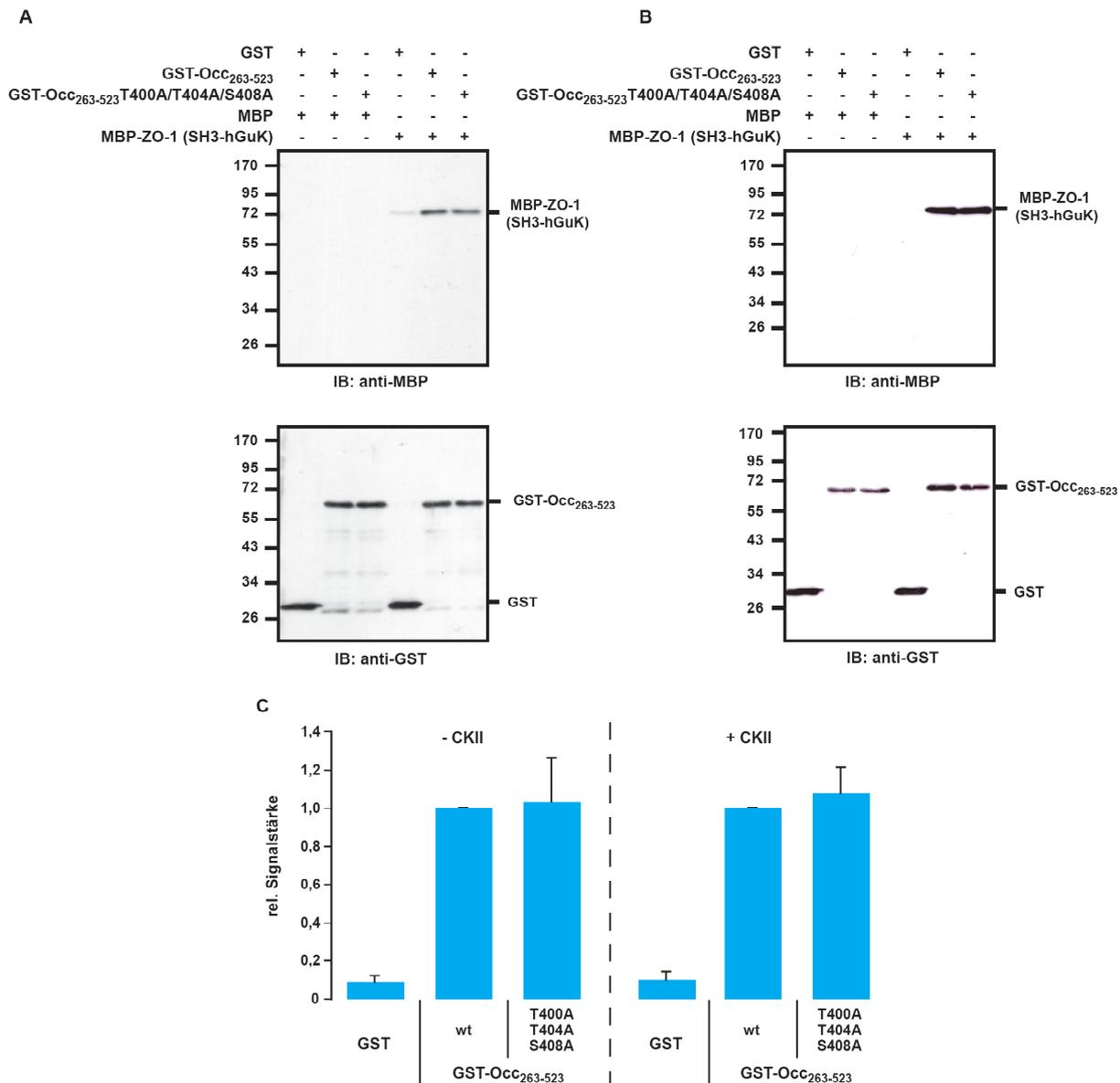


Abb. 18: Abhängigkeit der Occludin-ZO-1-Interaktion von Phosphorylierungen. *In vitro*-Assoziationsexperimente mit rekombinant hergestelltem GST-Occludin₂₆₃₋₅₂₃ und MBP-SH3-hGuK-ZO-1. Der Nachweis einer Interaktion erfolgte durch Western Blot mit anti-MBP (oben) und anti-GST Antikörpern (unten) als Kontrolle. **A)** Pull-Down ohne Vorphosphorylierung von GST, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ bzw. GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A. **B)** Pull-Down mit vorhergehender Phosphorylierung der GST-Konstrukte durch CKII. **C)** Quantitative Analyse der Bandenintensität für MBP-ZO-1 (SH3-hGuK) nach Pull-Down mit den GST-Fusionsproteinen aus drei unabhängigen *in vitro*-Assoziationsexperimenten. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Wie in Abb. 18A zu sehen ist, interagiert MBP-ZO-1-SH3-hGuK sowohl mit GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ als auch mit GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A (Spur 5 und 6), nicht aber mit GST alleine (Spur 1 und 4; Kontrolle). Dagegen ist kein Signal zu sehen, wenn nur GST, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ oder die Tripel-A-Mutante mit MBP inkubiert wurden (Kontrolle, Spur 2 und 3). Bei vorhergehender Phosphorylierung der GST-Konstrukte durch CKII zeigt sich ein identisches Bild (siehe Abb. 18B). Sowohl die Phosphorylierung von Occludin mit CKII als auch die

Einführung der T400A/T404A/S408A-Mutation hat keinen Einfluss auf die Stärke des Signals und damit ebenfalls keinen Einfluss auf die Interaktion mit ZO-1. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten für MBP-ZO-1 (SH3-hGuK) nach Pull-Down mit den GST-Occludin-Konstrukten ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abb. 18C).

4.3.2. Charakterisierung der Occludin-ZO-2-Interaktion in MDCK-Zellen

Zur Untersuchung der Interaktion von Occludin und ZO-2 wurden MDCK-Zellen mit pGW-HA-ZO-2 transfiziert und anschließend lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden gepoolt und in *in vitro*-Assoziationsexperimenten mit GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A sowie GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400E/T404E/S408E auf Bindung an HA-ZO-2 untersucht.

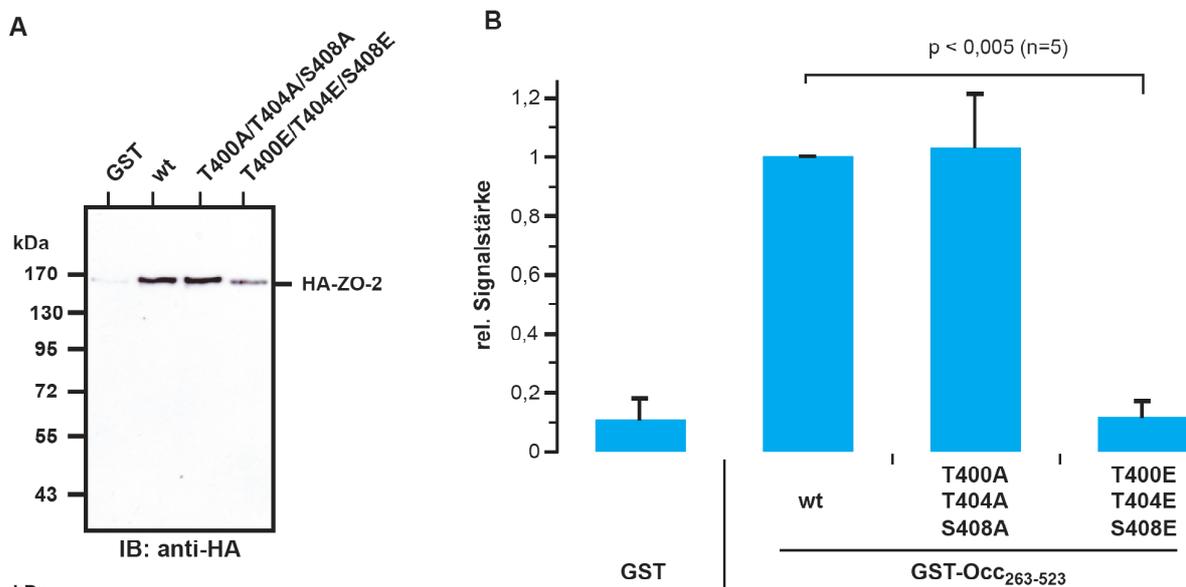


Abb. 19: Einfluss der CKII-Phosphorylierungsstellen auf die Interaktion von Occludin mit ZO-2 in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden transient mit pGW-HA-ZO-2 transfiziert und die Zelllysate mit GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃, GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A bzw. GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400E/T404E/S408E inkubiert. **A)** Western-Blot Analyse des Pull-Downs aus MDCK-Lysat mit anti-HA (oben) und anti-GST Antikörpern zur Kontrolle (unten). **B)** Quantifizierung der relativen Signalintensitäten von

HA-ZO-2. Die Bindung an Occludin wurde in 5 unabhängigen Versuchen analysiert, die quantitative Auswertung erfolgte über das Programm ImageJ.

Wie in Abb. 19A zu sehen ist, interagiert HA-ZO-2 sowohl mit GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ als auch mit GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A (oben). Die Bindung zu GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400E/T404E/S408E ist jedoch deutlich schwächer. Die Inputkontrolle (unten) zeigt, dass

gleiche Mengen an GST-Protein eingesetzt wurden. Die quantitative Analyse ergab eine Verminderung der Signalintensitäten von GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃T400E/T404E/S408E im Vergleich zu GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ um mehr als 80 % (Abb. 19B).

Da die nicht auftretenden Unterschiede bei Wildtyp-Occludin und Tripel-A-Mutante möglicherweise darauf zurückzuführen sind, dass die eingesetzten Konstrukte nicht phosphoryliert waren, wurden Co-Immunpräzitationsexperimente (Co-IP) durchgeführt die eine Phosphorylierung der Konstrukte durch endogene CKII erlauben. Dazu wurden MDCK-Zellen ausgesät, mit p3xFLAG-CMV14, p3xFLAG-CMV14-Occ, p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} oder p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400E/T404E/S408E} transient transfiziert und nach 48 h Zelllysate hergestellt. Für die anschließende Co-Immunpräzitation wurde ein anti-ZO-2 Antikörper und ein Kaninchen-IgG als Kontrolle eingesetzt.

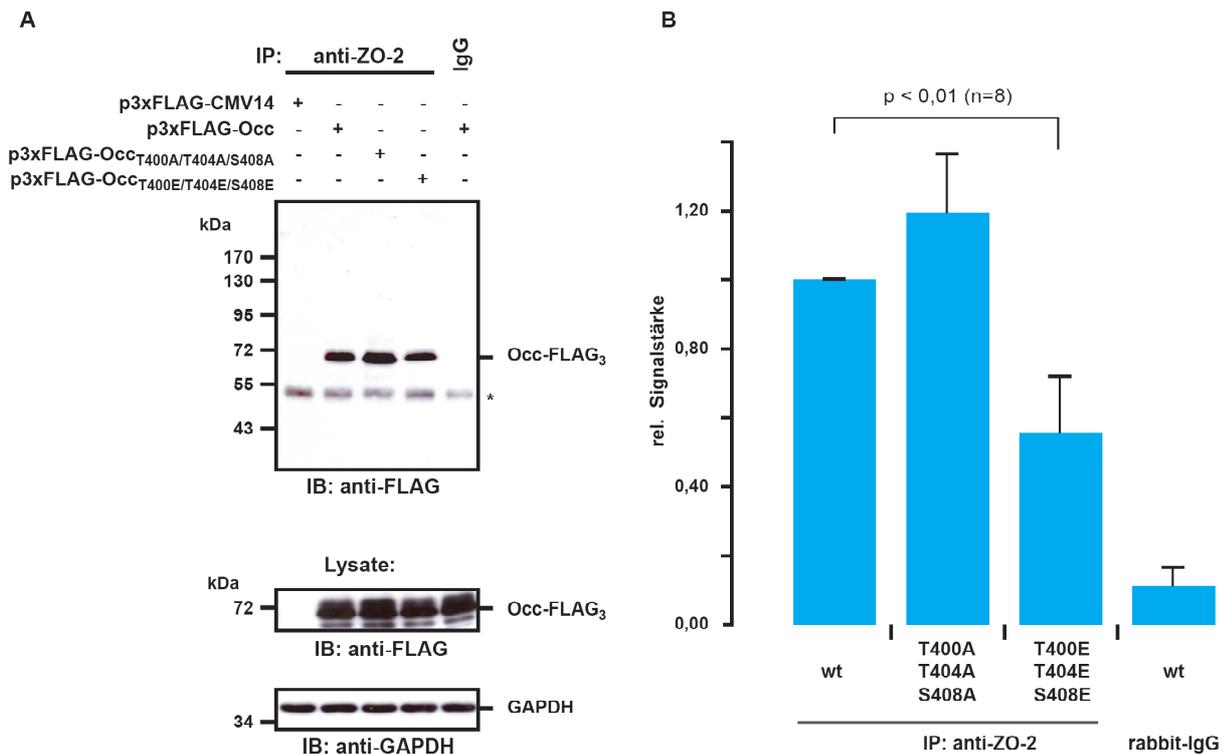


Abb. 20: Co-Immunpräzitation von Occludin mit ZO-2 in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden transient mit p3xFLAG-CMV14, p3xFLAG-CMV14-Occ, p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} bzw. p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400E/T404E/S408E} transfiziert und eine Immunpräzitation mit einem anti-ZO-2 Antikörper gegen endogenes ZO-2 bzw. mit einem Kaninchen-IgG als Kontrolle durchgeführt. **A)** Western-Blot-Analyse mit einem anti-FLAG-M2 Antikörper zum Nachweis von co-präzipitiertem Occludin (oben). Zur Überprüfung, ob die Konstrukte in vergleichbaren Mengen transfiziert wurden und als Ladekontrolle, wurden die Zelllysate mit anti-FLAG-M2 und anti-GAPDH Antikörpern analysiert (unten). **B)** Quantifizierung der relativen Signalstärke und Standardfehler nach Auswertung von 8 unabhängigen Experimenten.

Nach der Immunpräzipitation mit dem anti-ZO-2 Antikörper (endogenes ZO-2) konnte in den Lysaten, die mit p3xFLAG-CMV14-Occ, p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} oder p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400E/T404E/S408E} transfiziert waren (Abb. 20A; Spur 2, 3 und 4), eine Interaktion mit Vollängen-Occludin-FLAG₃ nachgewiesen werden. Dabei war das Signal für Occ_{T400A/T404A/S408A} stärker und für Occ_{T400E/T404E/S408E} schwächer im Vergleich zum Wildtyp Occludin. In den Kontrollen mit IgG (Spur 5) konnte dagegen kein Occludin-FLAG₃ detektiert werden. Nach Quantifizierung der Signale auf den Western Blots zeigte sich für die Tripel-A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein nicht signifikanter Anstieg der Bindung zu ZO-2, wohingegen die Bindung der Tripel-E-Mutante auf unter 50 % reduziert war.

4.4 Physiologische Bedeutung der CKII-abhängigen

Phosphorylierung

Phosphorylierungen spielen bei der Regulation der Barrierefunktion und Integrität der Tight Junctions eine entscheidende Rolle. Zur Untersuchung, ob die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin einen Einfluss auf dessen Lokalisation an den TJs hat und ob dies die Integrität der TJs beeinflusst, wurden MDCK-Zellen generiert, die stabil Occludin-FLAG₃ sowie die Phosphorylierungs-defiziente Mutante Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ und die Phosphomimikry-Mutante Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ exprimieren.

Die erfolgreiche Transfektion wurde anhand von Zelllysaten in Western-Blot-Analysen unter Verwendung des anti-FLAG-M2 Antikörpers kontrolliert. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, exprimieren die, mit p3xFLAG-CMV14-Occ, p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} bzw. p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400E/T404E/S408E} transfizierten Klone die Occludin-FLAG₃-Varianten in annähernd vergleichbaren Mengen. Das Lysat Mock-transfizierter Zellen (p3xFLAG-CMV14) zeigte dagegen kein FLAG-Signal.

Zur Kontrolle wurde zusätzlich die Expression endogener TJ-Proteine mit anti-ZO-1, anti-ZO-2, anti-Claudin-1 und anti-Claudin-2 Antikörpern überprüft. Wie an den Expressionsleveln im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen zu entnehmen ist, hatte die Transfektion der FLAG₃-getaggtten Occludin-Konstrukte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der anderen TJ-Proteine (Abb. 21). Lediglich die Expression von Claudin-2 scheint in dem Wildtyp-Klon und in der Tripel-E-Mutante herunterreguliert zu sein.

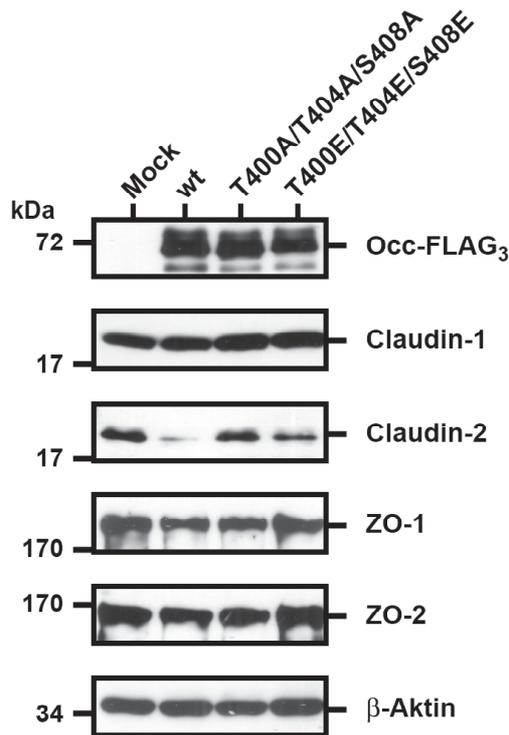


Abb. 21: Transfektionskontrolle der stabilen MDCK-Klone. Western-Blot-Analyse mit anti-FLAG-M2, anti-ZO-1, anti-ZO-2, Claudin-1, -2 und β -Actin (Ladekontrolle) Antikörpern. MDCK-Zellen wurden stabil mit p3xFLAG-CMV14 (mock), p3xFLAG-CMV14-Occ, p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} bzw. p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} transfiziert. Zellysate wurden generiert und gleiche Mengen an Gesamtprotein auf einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Phosphorylierungen von Occludin durch c-Src an Y389/Y402 zu einer verminderten Membranlokalisation und einer Verzögerung der Re-Assemblierung der Tight Junctions nach Calcium-Switch führen [Elias et al., 2009]. Dagegen resultiert eine Phosphorylierung von Occludin an T403/T404A in einer verstärkten Membranlokalisation und einer verbesserten Integrität der TJs [Suzuki et al., 2009]. Diese Aminosäuren liegen in unmittelbarer Nähe zu den hier identifizierten CKII-Phosphorylierungsstellen. Daher war ein Einfluss der Aminosäuren T400/T404/S408 auf die Lokalisation von Occludin sowie die Assemblierung der TJs denkbar.

Zur Untersuchung der CKII-abhängigen Lokalisation, wurden die stabil exprimierenden Klone auf Deckgläschen ausgesät und die Lokalisation der Occludin-FLAG₃-Varianten sowie von ZO-1 als TJ-Marker in Immunfluoreszenzanalysen untersucht. In Abb. 22 ist exemplarisch das Ergebnis einer konfokalen Aufnahme gezeigt. Die ZO-1 Färbung zeigt für alle Klone eine deutliche Membranlokalisation von ZO-1 in den TJs (Abb. 22B). Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ sowie Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ kolokalisieren mit ZO-1.

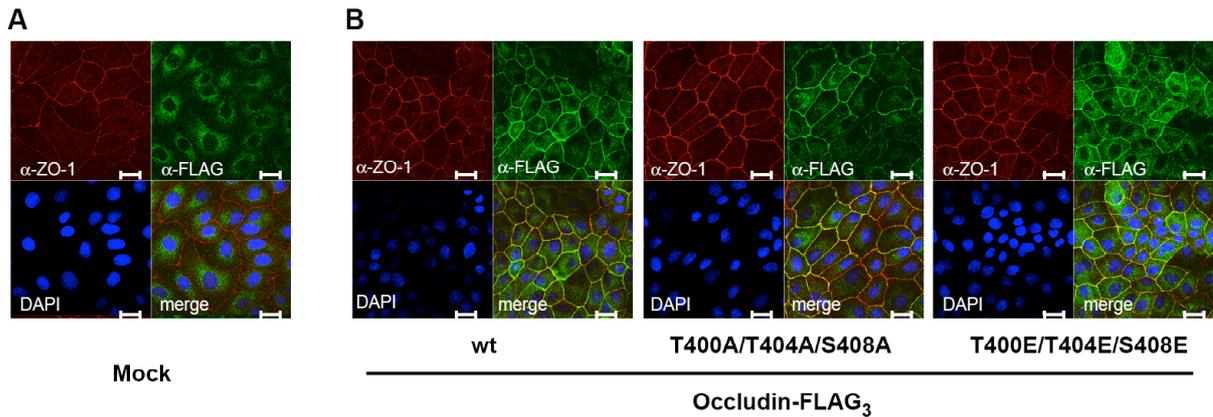


Abb. 22: Lokalisation der Occludin Varianten. Konfokale Aufnahme der stabil transfizierten MDCK-Zellen. **A)** Mock-transfizierte MDCK-Zellen wurden mit einem anti-FLAG-M2 (grün) sowie anti-ZO-1 Antikörper (rot), die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. **B)** MDCK-Zellen, die stabil p3xFLAG-CMV14-Occ, p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400A/T404A/S408A} bzw. p3xFLAG-CMV14-Occ_{T400E/T404E/S408E} exprimieren. Die Mergedarstellung zeigt eine Kolo-kalisation der FLAG₃-getaggten Occludin Konstrukte mit ZO-1 an den TJs. Maßstabsbalken: 20 μm.

4.4.1. Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf die Assemblierung der TJs

Zur Untersuchung der Dissoziation der Tight Junctions nach Calciumentzug bzw. der Re-Assemblierung nach Wechsel zu normalen Calcium-Konzentrationen wurden Calciumswitch-Experimente mit den stabil transfizierten MDCK-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden die MDCK-Zellen, die stabil Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ sowie Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ exprimieren in Medium mit einer physiologischen Calcium-Konzentration (NC) kultiviert. Anschließend erfolgte ein Wechsel zu einem Medium mit niedriger Calcium-Konzentration (LC) und nach 90 min erneut zu NC-Medium. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und mit α-FLAG und α-ZO-1 Antikörpern bzw. DAPI angefärbt.

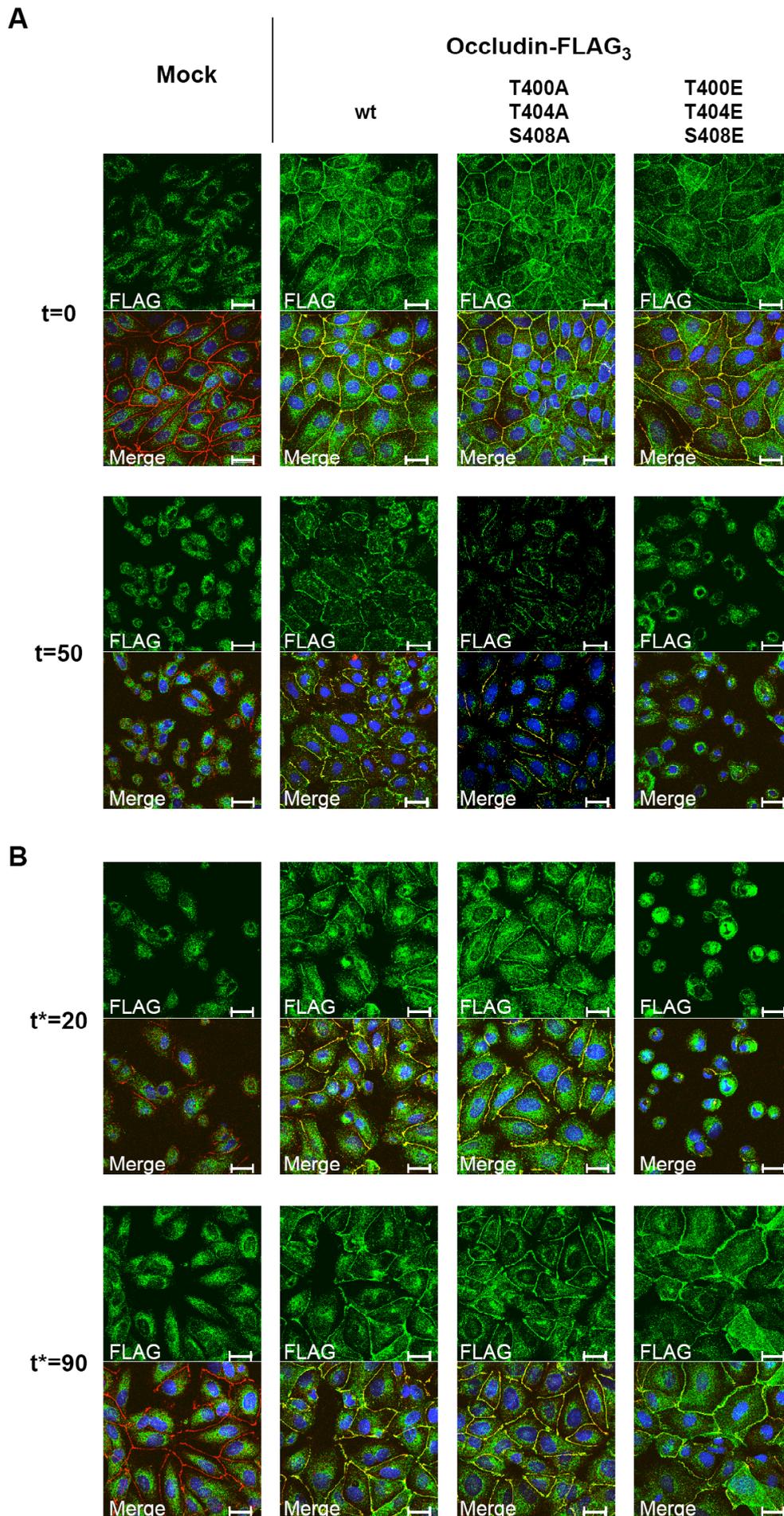


Abb. 23: Calcium-Switch. Konfokale Aufnahme nach Immunfärbung mit einem anti-FLAG-M2 (rot), anti-ZO-1 Antikörper (grün) und DAPI (Zellkerne; blau). MDCK-Zellen die stabil Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ und Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ exprimieren wurden, nach Inkubation unter physiologischen Calciumkonzentrationen (NC-Bedingungen), für 90 min mit Niedrigcalcium-Medium (LC-Bedingungen/Dissoziation) inkubiert. Anschließend erfolgte erneut ein Wechsel zu NC-Bedingungen (Re-Assemblierung) **A**) Dissoziation des TJ-Komplexes. Nach 50 min Inkubation in LC-Medium wurden die Zellen fixiert. **B**) Re-Assemblierung des TJ-Komplexes. 20 bzw. 90 min nach dem Wechsel zu NC-Bedingungen wurden die Zellen fixiert. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Dissoziation des TJ-Komplexes nach Calciumentzug ist in den Zellen, die stabil Occludin-FLAG₃ sowie Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ exprimieren verzögert (Abb. 23A). Sowohl für die FLAG-getaggtetes Occludin als auch für ZO-1 ist nach 50 min eine Färbung an den TJs zu erkennen, während Mock-transfizierte und Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ exprimierende Zellen kaum noch Färbung an den TJs aufweisen. Nach 90 min Calcium-Entzug ist für alle Zellen die Dissoziation des TJ-Komplexes abgeschlossen (nicht gezeigt). Weder FLAG-getaggtetes Occludin, noch ZO-1 als TJ-Marker konnten zu diesem Zeitpunkt an der Membran nachgewiesen werden.

Ähnliches ist für die Re-Assemblierung des TJ-Komplexes zu beobachten (Abb. 23B). Occludin-FLAG₃ sowie Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ sind früher an der Membran nachweisbar als Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃. ZO-1 scheint dabei zeitgleich mit Occludin an die Membran zu gelangen. Dort co-lokalisiert ZO-1 mit den entsprechenden Occludin-Konstrukten.

4.4.2. Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf die Barriereigenschaften der TJs

Da die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin die parazellulären Barriereigenschaften der TJs beeinflussen könnte, wurden die Widerstände verschiedener Klone der MDCK-Zellen, die stabil Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ oder Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ exprimieren über Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne M. Krug (Institut für Klinische Physiologie, Charité) gemessen. Diese Analysen erlauben die Unterscheidung zwischen dem parazellulären Widerstand (R^{para}), der den Widerstand der TJs widerspiegelt, sowie dem transepithelialen Widerstand (R^{trans}), welcher dem Widerstand der apikalen und basolateralen Membranen entspricht. Der epitheliale Widerstand (R^{epi}) setzt sich aus R^{para} und R^{trans} zusammen und ergibt mit dem subepithelialen Widerstand den transepithelialen Gesamtwiderstand des Epithels (TER).

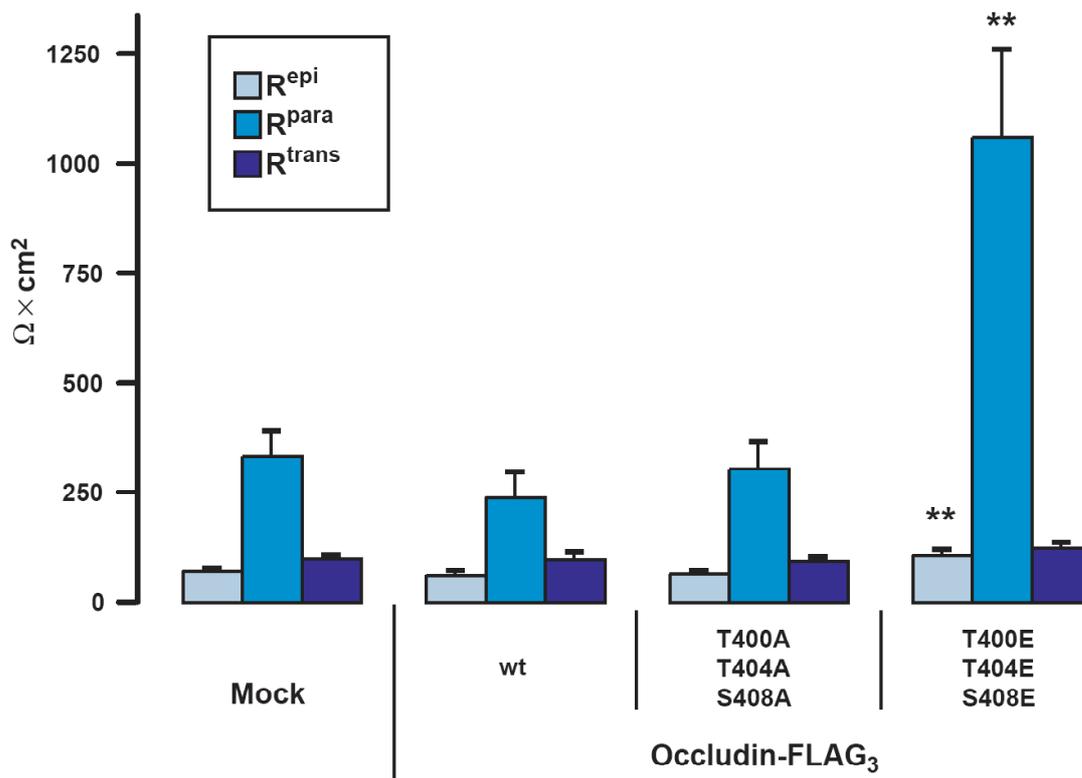


Abb. 24: Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie. Jeweils zwei unterschiedliche Klone der stabil mit Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ und Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ transfizierten MDCK-Zellen wurden auf Transwell-Filtern ausgesät und die Widerstände gemessen. Dargestellt sind die gemittelten Messwerte des epithelialen (R^{epi}), des transzellulären (R^{trans}) sowie des parazellulären (R^{para}) Widerstandes aus mindestens 12 unabhängigen Untersuchungen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern nach Bonferroni-Korrektur. ** p < 0,01 in Bezug auf die Mock-transfizierten Zellen.

In Abb. 24 ist der Einfluss der stabilen Expression auf den epithelialen Widerstand der MDCK-Zellen gezeigt. Im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen (R^{epi} = 71,5 ± 5,4 Ωcm²; R^{para} = 333,7 ± 56,7 Ωcm²; R^{trans} = 100,6 ± 6,2 Ωcm²) zeigen die mit Wildtyp Occludin-FLAG₃ (R^{epi} = 62,9 ± 9,3 Ωcm²; R^{para} = 239,2 ± 58,7 Ωcm²; R^{trans} = 99,5 ± 14,5 Ωcm²) sowie Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ (R^{epi} = 65,0 ± 5,8 Ωcm²; R^{para} = 305,6 ± 59,9 Ωcm²; R^{trans} = 95,7 ± 8,1 Ωcm²) transfizierten MDCK-Zellen keine Änderung des epithelialen Widerstandes.

Im Gegensatz dazu ist der epitheliale Widerstand in den mit der Phosphomimikry-Mutante Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ transfizierten Zellen (R^{epi} = 109,1 ± 10,6 Ωcm²), stark erhöht (p = 0,009). Dies ist hauptsächlich in einer starken Zunahme des parazellulären Widerstandes begründet (R^{para} = 1061,9 ± 198,9 Ωcm²; p = 0,003). Der transzelluläre Widerstand (R^{trans} = 125,9 ± 12,0 Ωcm²) ist nicht signifikant verändert (p = 0,19).

4.4.3. Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf Proliferation

Aus der Literatur ist bekannt, dass Occludin die Wachstumsrate bestimmter Tumoren beeinflussen kann. Beispielsweise inhibiert Occludin das Raf-1 induzierte Tumorwachstum [Wang et al., 2005]. Darüber hinaus ist Occludin in vielen Tumorzellen herunterreguliert [Tsukita et al., 2008]. Daher wurde vermutet, dass Occludin einen extrinsischen Signalweg aktivieren kann, der den programmierten Zelltod induziert.[Beeman et al., 2009].

Aus diesem Grund wurde die Proliferationsrate der stabil exprimierenden MDCK-Zellen über den metabolische Umsatz eines XTT-Farbstoffes untersucht. Wie Abb. 25 zu entnehmen ist unterscheiden sich die Umsatzraten der mit den Occludin-FLAG₃-Konstrukten transfizierten Zellen im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen nicht. Dies bedeutet, dass weder die stabile Transfektion von Occludin-FLAG₃ noch die Transfektion der mutierten Occludin-FLAG₃-Varianten einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat.

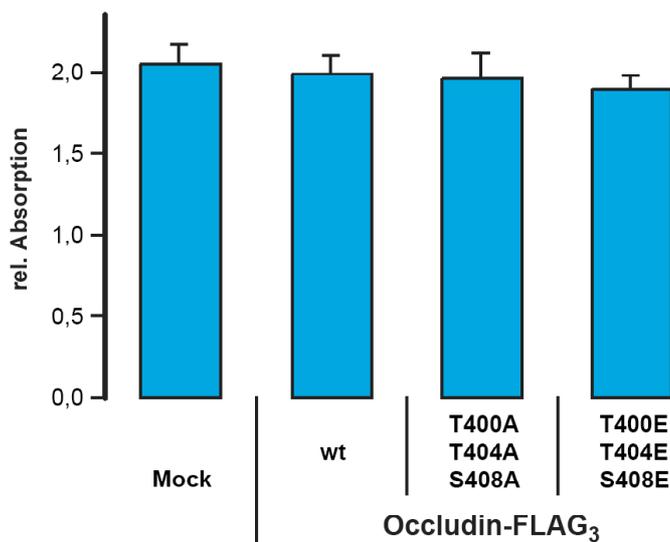


Abb. 25: Proliferation der stabilen Klone. Die Proliferationsrate der stabil exprimierenden MDCK-Zellen wurde mit dem Cell Proliferation Kit II (Roche) gemessen. Die Werte repräsentieren die Durchschnittswerte sowie die Standardfehler aus n = 8 unabhängigen Analysen über einen Zeitraum von 6,5 h.

5. Diskussion

Occludin ist eine zentrale Transmembrankomponente der Tight Junctions. Diese Zell-Zell-Verbindungen sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, regulieren die Barriere für den parazellulären Transport und sichern die Polarität der Zellen [Chiba et al., 2008]. Bis heute konnten neben Occludin zahlreiche Transmembranproteine wie Tricellulin oder die Claudine sowie peripher assoziierte Proteine wie die Zonula occludens Proteine ZO-1, -2 und -3 als Komponenten der TJs identifiziert und charakterisiert werden. Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Funktion von Occludin in den TJs wurde bisher allerdings weniger genau untersucht.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit Phosphorylierungsstellen zu identifizieren und die Auswirkungen dieser Phosphorylierungen auf die Barriereigenschaften der Tight Junctions zu analysieren.

5.1 Occludin interagiert mit den Kinasen CKI und CKII

Aus eigenen Vorversuchen und vorhergehenden Studien war bekannt, dass Occludin durch die Casein-Kinasen CKI ϵ und CKII phosphoryliert werden kann [McKenzie et al., 2006][Cordenonsi et al., 1999; Smales et al., 2003]. Dabei wurden teilweise Occludin-Konstrukte aus *Xenopus laevis* und *Mus musculus* verwendet. Die physiologische Rolle dieser Phosphorylierungen konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob humanes Occludin mit den Kinasen CKI und CKII interagieren kann. In Untersuchungen mit FLAG-getagtem Occludin und CKI ϵ -myc₆ bzw. HA-CKII α und myc₆-CKII β konnte in Co-Immunpräzipitationsexperimenten eine Interaktion von Occludin mit CKI und CKII in HEK293-Zellen nachgewiesen. Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurden Pull-Down-Analysen mit rekombinant hergestellten GST-Occludin-Varianten und CKI δ bzw. CKII durchgeführt. Dabei konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CKI δ im C-terminalen Bereich (AS263-523) von Occludin bindet.

Für CKII konnte die Bindedomäne auf die distale Domäne der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (AS263-381) von Occludin eingegrenzt werden. Interessanterweise liegen die von der Arbeitsgruppe Staddon beschriebenen CKII-Phosphorylierungsstellen ausserhalb des hier identifizierten Bindungsbereiches im proximalen Bereich der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Occludin [Smales et al., 2003].

Demnach würden die identifizierten Aminosäuren Thr375 und Ser379 (entspricht T404 und S408 im humanen Occludin) in der distalen Region der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (AS381-523) von Occludin liegen. Die Kristallstruktur der proximalen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Occludin liefert möglicherweise eine Erklärung für dieses Phänomen. So enthält diese Domäne drei coiled-coil Strukturen, die für sich zwar relativ starr sind, aber über sehr flexible Grenzregionen verbunden sind [Li et al., 2005]. Eine ähnliche Flexibilität zwischen CKII-Bindedomäne und den Phosphorylierungsstellen könnte CKII nach Bindung an Occludin in direkten Kontakt mit den Phosphorylierungsstellen bringen. Zur endgültigen Bestätigung dieser Vermutung ist jedoch die Aufklärung der gesamten Tertiärstruktur nach Co-Kristallisation mit CKII, notwendig.

5.2 CKI phosphoryliert Occludin

Zur Untersuchung, ob die verwendeten Occludin-Konstrukte durch die Kinase CKI phosphoryliert werden können, wurden *in vitro*-Kinasierungsexperimenten mit radioaktiv markiertem γ -P³²-ATP und GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Dabei konnte für die N- und die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Occludin (AS1-63 und AS263-523) eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Zur Identifizierung potentieller CKI-Phosphorylierungsstellen wurde die Sequenz von Occludin mit den Programmen NetPhos 2.0 [Blom et al., 1999], GPS [Xue et al., 2008] und KinasePhos [Huang et al., 2005] auf charakteristische Erkennungssequenzen für CKI untersucht. Darüber hinaus wurden die cytoplasmatischen Domänen von Occludin *in vitro* mit CKI phosphoryliert und die phosphorylierten Aminosäuren über MALDI/TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die potentiellen Phosphorylierungsstellen (Aminosäuren S25, S277, S302, T305, S313, S326, S327, S341, T403, T404 und S408) wurden zu Alanin mutiert und die erhaltenen Konstrukte hinsichtlich einer Phosphorylierung durch CKI analysiert. Dabei konnte jedoch für keine der eingeführten Mutationen eine signifikante Reduktion im Phosphorylierungsgrad festgestellt werden. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, dass zusätzlich zu den mutierten Aminosäuren weitere Aminosäuren phosphoryliert werden, oder dass die in dem präparativen Ansatz identifizierten Aminosäuren Phosphorylierungsartefakte darstellen.

5.3 CKII phosphoryliert Occludin an den Aminosäuren T400, T404 und S408

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aminosäuren T375/S379 (*Xenopus laevis*) bzw. T403/S407 (*Mus musculus*) als potentielle CKII-Phosphorylierungsstellen dienen können [Cordenonsi et al., 1997; Cordenonsi et al., 1999; Smales et al., 2003].

Daher wurde zunächst anhand von rekombinant exprimierten GST-Fusionsproteinen untersucht, ob ebenfalls die cytoplasmatischen Domänen des humanen Occludin ein Substrat für CKII darstellen. Dabei zeigte sich, dass CKII im Gegensatz zu CKI lediglich die C-terminale cytoplasmatische Domäne phosphoryliert. Durch sequentielle Mutation der zu *Xenopus laevis* bzw. *Mus musculus* homologen Aminosäurereste S408 und T404 zu Alanin konnte der CKII-abhängige Phosphorylierungsgrad immer weiter reduziert werden. Dennoch war in der Doppelmutante eine Restphosphorylierung detektierbar. Aus diesem Grund wurde eine weitere Aminosäure, die sich in dem gleichen Abstand und in unmittelbare Nähe zu den bereits mutierten befindet, zusätzlich mutiert (T400A/T404A/S408A). Durch das Einführen dieser Mutation konnte die CKII-abhängige Phosphorylierung vollständig inhibiert werden.

Dieses Sequenzmotiv lässt vermuten, dass es sich bei der CKII-abhängigen Phosphorylierung um einen kooperativen Prozess handelt. Das bedeutet, dass die Phosphorylierung an S408 die weitere Phosphorylierung der N-terminalen Threonine T404 und T400 verstärkt. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphomimikry-Mutante S408E jeweils stärker phosphoryliert wird als die entsprechenden A-Mutanten. Dies lässt sich erklären, wenn man die beschriebene Konsensussequenz von CKII mit dem hier untersuchten Motiv vergleicht.

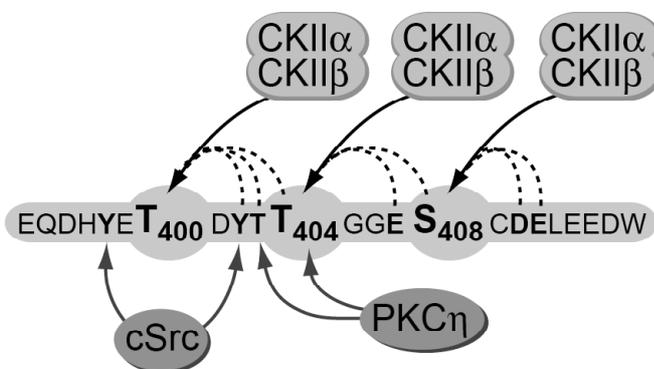


Abb. 26: Sequentielle Phosphorylierungen an Occludin.

Dargestellt ist der untersuchte Sequenzbereich von Occludin. Die an der kooperativen Phosphorylierung beteiligten AS wurden fett unterlegt. Die Phosphorylierung von S408 durch CKII führt zu einem verbesserten Konsensusmotiv für T404, Phosphorylierung von T404 verbessert das T400-Konsensusmotiv. Darüber hinaus kann PKC η an T403/T404 bzw. cSrc an Y398/Y402 phosphorylieren und möglicherweise zur kooperativen Phosphorylierung beitragen.

Wie in Abb. 26 dargestellt, entspricht die Sequenz S408-C-D-E dem optimalen Konsensusmotiv S/T-X_{1,2}-E/D von CKII [St-Denis and Litchfield, 2009]. Dies gilt ebenfalls für T404-G-G-E. Darüber hinaus ist bekannt, dass negative Reste in den Positionen +1, +2, +4 die Phosphorylierung eines Substrates durch CKII verstärken [Meggio and Pinna, 2003]. Eine Phosphorylierung an S408 oder die Mutation von S408 zu Glutamat führt zu einem optimierten CKII-Konsensusmotiv und verstärkt letztendlich die Phosphorylierung an T404. Dagegen entspricht T400-D-Y-T nur der optimalen Konsensussequenz, wenn das C-terminale Threonin phosphoryliert vorliegt. Demnach würde man erwarten, dass an dieser Position keine Phosphorylierung stattfindet, wenn das C-Terminale T404 nicht phosphoryliert vorliegt oder zu Alanin mutiert wurde. Womöglich ist jedoch bereits eine minimale Konsensussequenz ausreichend. Darüber hinaus wäre ebenfalls eine kooperative Phosphorylierung durch andere Kinasen denkbar. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass PKC η die Aminosäuren T403 und T404 phosphorylieren kann und dies zu einer verstärkten Membranlokalisierung von Occludin führt und die Barrierefunktion der TJs stärkt [Suzuki et al., 2009]. Durch diese Phosphorylierung entsteht wiederum eine ideale Konsensussequenz für CKII (Abb. 26). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, inwiefern die beschriebenen Effekte der PKC-abhängigen Phosphorylierung durch CKII beeinflusst werden bzw. *vice versa* die CKII-abhängigen Effekte durch PKC beeinflusst werden können.

5.4 Phosphorylierung von Occludin durch GSK3 β

Das oben beschriebene Sequenzmotiv entspricht ebenfalls einer potentiellen GSK3 β -Phosphorylierungsstelle. Zur Untersuchung, ob Occludin tatsächlich ein Substrat für GSK3 β darstellt, wurden Kinasierungsexperimente mit rekombinant exprimierten GST-Fusionsproteinen der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Occludin (GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃) und rekombinanter GSK3 β durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Occludin *in vitro* durch GSK3 β phosphoryliert werden kann.

Für die in den Kinasierungsexperimenten untersuchten Occludin-Mutanten ließ sich ebenfalls eine Phosphorylierung durch GSK3 β nachweisen, wobei der Phosphorylierungsgrad der T404A-Mutanten im Vergleich zu den unmutierten T404-Konstrukten reduziert zu sein scheint. Dies ist ein Hinweis darauf, dass T404 von GSK3 β phosphoryliert wird.

Das Signal für die Phosphorylierung war jedoch deutlich schwächer im Vergleich zur Phosphorylierung mit CKI oder CKII. Dies liegt möglicherweise daran, dass Occludin kein

optimales Substrat für GSK3 β darstellt oder, dass zusätzliche Phosphorylierungen notwendig sind, um ein ideales Sequenzmotiv zu erstellen.

In Übereinstimmung dazu ist bekannt, dass die häufigsten Substrate von GSK3 β wie beispielsweise die Glycogen-Synthase oder β -Catenin zunächst durch eine andere Kinase an einem Serin oder Threonin phosphoryliert werden müssen, das typischerweise vier Reste entfernt auf der C-terminalen Seite der eigentlichen GSK3 β -Phosphorylierungsstelle lokalisiert ist [Cohen and Frame, 2001]. Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurde GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ in Anwesenheit von unmarkiertem ATP und CKI δ bzw. CKII vorphosphoryliert. Anschließend wurden Kinasierungsexperimente mit radioaktiv markiertem γ -P³²-ATP durchgeführt. Es konnte jedoch nach Vorphosphorylierung von GST-Occ₂₆₃₋₅₂₃ durch CKI keine Phosphorylierung durch GSK3 β nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass unter den gegebenen Bedingungen keine sequentiellen Phosphorylierungsereignisse an Occludin ablaufen. Für GST- β -Catenin (Kontrolle) ließ sich dagegen eine serielle Phosphorylierung durch CK1 und GSK3 β nachweisen.

Das komplette Verschwinden des Phosphorylierungssignals für Occludin bei diesen Analysen im Vergleich zu den Untersuchungen ohne Vorphosphorylierung ist möglicherweise auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (eingesetzte Aktivität der Kinase sowie Phosphorylierungsdauer) zurückzuführen. Darüber hinaus ist denkbar, dass beide Kinasen die gleiche(n) Aminosäure(n) als Substrat erkennen oder dass die erhaltenen Signale Artefakte darstellen. Es sind aber weitere Untersuchungen nötig, um diese Frage endgültig zu klären.

Nach Vorphosphorylierung von Occludin durch CKII konnten ebenfalls keine Phosphorylierung durch GSK3 β nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

5.5 Die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin moduliert die Interaktion zwischen Occludin und den ZO-Proteinen

In vorhergehenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Phosphorylierungen von Occludin dessen Bindung an die Zonula occludens Proteine-1 und -2 modulieren können. Daher wurden die Bindungseigenschaften von Occludin an ZO-1 und ZO-2 in Abhängigkeit der Phosphorylierungen durch CKII untersucht.

5.5.1. Interaktion von Occludin und ZO-2

Dazu wurden MDCK-Zellen transient mit pGW-HA-ZO-2 transfiziert und die Lysate mit den GST-Fusionsproteinen der C-terminalen cytoplasmatischen Domänen von Occludin inkubiert. In den anschließenden Pull-Down Experimenten konnten Komplexe aus GST-Occl₂₆₃₋₅₂₃ bzw. GST-Occl₂₆₃₋₅₂₃T400A/T404A/S408A und HA-ZO-2 isoliert werden. Die Signale für die Bindung von Occl₂₆₃₋₅₂₃T400E/T404E/S408E an HA-ZO-2 waren um 80 % reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Einführung der phosphomimetischen E-Mutationen in Occludin die Bindung zu ZO-2 reduziert. Diese Ergebnisse konnten über Immunpräzipitation mit Vollängen-Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ und Occludin_{T400E/T404E/S408E}-FLAG₃ bestätigt werden. Mit Hilfe der Wildtyp- bzw. T400A/T404A/S408E-Konstrukte konnte endogenes ZO-2 präzipitiert werden. Das phosphomimetische T400E/T404E/S408E-Konstrukt zeigte jedoch eine stark reduzierte ZO-2-Bindung.

Kürzlich wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass c-Src Occludin an den Aminosäuren Y398/Y402 phosphoryliert. Die Mutation dieser Aminosäuren zu Aspartat reduziert ebenfalls die Bindung zu ZO-1 und -2 [Elias et al., 2009; Kale et al., 2003]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass VEGF die Phosphorylierung von Occludin an S490 stimuliert. Dies resultiert in einer verminderten Bindung zu ZO-1 [Sundstrom et al., 2009].

Aufgrund der Nähe dieser Phosphorylierungsstellen zu dem hier untersuchten Sequenzmotiv ist zu vermuten, dass dieser Bereich für die Regulation der Interaktion von Occludin und den ZO-Proteinen von besonderer Bedeutung ist. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (AS283-522) von Occludin ist bekannt, dass die in Occludin enthaltene coiled-coil-Domäne viele positiv geladene Aminosäurereste enthält, die für die Bindung zu ZO-1 entscheidend sind [Li et al., 2005]. Phosphorylierungen im angrenzenden Bereich führen zu einer Anhäufung negativer Ladungen an der Oberfläche und könnten so das Bindemotiv zerstören.

5.5.2. Interaktion von Occludin und ZO-1

Da gezeigt werden konnte, dass die rekombinant exprimierte C-terminale Domäne von Occludin an ZO-1 binden kann [Wittchen et al., 1999] und die SH3-hGuK-Domäne von ZO-1 das Bindemotiv für Occludin enthält [Schmidt et al., 2004], wurden *in vitro*-Assoziationsexperimente mit rekombinant exprimierten GST-Fusionsproteinen der C-cytoplasmatischen Domänen von Occludin (Occludin₂₆₃₋₅₂₃ wt und T400A/T404A/S408A) und MBP-ZO-1 (SH3-hGuK) durchgeführt. Dabei konnte kein Unterschied in den

Bindungseigenschaften zwischen Wildtyp-Occludin und der Tripel-A-Mutante festgestellt werden. Um den Einfluss der CKII-abhängigen Phosphorylierung auf die Bindung zu untersuchen, wurden die GST-Fusionsproteine in einem analogen Ansatz *in vitro* mit CKII phosphoryliert und erneut *in vitro*-Assoziationsexperimente mit MBP-ZO-1 (SH3-hGuK) durchgeführt. Dabei konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Bindung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin keinen Einfluss auf die Interaktion von Occludin und ZO-1 ausübt.

Da hierbei jedoch ein verkürztes ZO-1-Konstrukt verwendet wurde, und nicht auszuschließen ist, dass die deletierten Bereiche hinsichtlich der Bindungseigenschaften zu Occludin eine regulatorische Funktion besitzen, sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Beobachtungen zu stützen.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Phosphorylierung von Occludin auf die Bindung an ZO-1 bzw -2 sind nicht unbedingt verwunderlich, da ähnliche Effekte bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen wurden. Beispielsweise führt die Phosphorylierung von Y389/Y402 zu einer verstärkten ZO-3-Bindung, destabilisiert aber die ZO-1-Occludin-Interaktion [Elias et al., 2009].

5.6 Die physiologische Bedeutung der CKII-abhängigen Phosphorylierung von Occludin

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der CKII-abhängigen Phosphorylierung von Occludin wurden MDCK-Zellen generiert, die stabil Occludin-FLAG₃, Occludin_{T400A/T404A/S408A}-FLAG₃ sowie Occludin_{T400EA/T404E/S408E}-FLAG₃ exprimieren. Die erfolgreiche Transfektion konnte im Western Blot nachgewiesen werden. Dabei exprimierten die verwendeten Klone die Occludin-FLAG₃-Konstrukte in annähernd gleichen Mengen. Um sekundäre Effekte der Transfektion auszuschließen, wurden die Expressionslevel der TJ-Proteine ZO-1, ZO-2, Claudin-1 sowie Claudin-2 ebenfalls im Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass, im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen, keine Änderung in der Expression der untersuchten TJ-Proteine auftrat. Lediglich ein Wildtyp-Klon sowie eine Tripel-E-Mutante zeigten eine reduzierte Claudin-2 Expression.

5.6.1 Lokalisation der Occludin-Konstrukte

ZO-Proteine sind die Hauptadapterproteine die die TJs mit dem Cytoskelett verknüpfen. Die Interaktion der ZO-Proteine mit der C-terminalen Domäne von Occludin sowie dem Actin-

Cytoskelett ist ausschlaggebend für die Assemblierung und die Aufrechterhaltung der Occludin-Lokalisation in den TJs [Furuse et al., 1994; Itoh et al., 1999b].

Daher wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob durch die Einführung der Phosphorylierungs-defizienten Tripel-A-Mutation bzw. der phosphomimetischen Tripel-E-Mutation die Lokalisation der Occludin-FLAG₃-Konstrukte beeinflusst wird. Durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass alle Occludin-Varianten in MDCK-Zellen an der Membran lokalisiert sind und mit dem TJ-Marker ZO-1 co-lokalisieren. Dies deutet darauf hin, dass die CKII-abhängige Phosphorylierung selbst keinen direkten Einfluss auf die Lokalisation von Occludin ausübt.

5.6.2. Dissoziation und Reassemblierung der Tight Junctions

Zur Untersuchung, ob die eingeführten Mutationen der CKII-Phosphorylierungsstellen die Kinetik der Assemblierung bzw. der Dissoziation der TJs beeinflussen, wurden Ca²⁺-Switch Experimente mit den stabil transfizierten MDCK-Zellen durchgeführt. Über konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie konnte nach Ca²⁺-Entzug für die T400E/T404E/S408E-Mutante - im Vergleich zu Wildtyp-Occludin sowie zur T400A/T404A/S408A-Mutante - eine beschleunigte Dissoziation aus den Zell-Zellkontakten nachgewiesen werden. Bei der Reassemblierung konnte wiederum für die Tripel-E-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-Occludin eine Verzögerung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass Phosphorylierungen der CKII-Phosphorylierungsstellen die Integrität der TJs schwächen und die Dissoziation von Occludin aus den interzellularen Junctions begünstigen.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt werden, dass die Y398D/Y402D-Mutation der c-Src-Phosphorylierungsstellen in Occludin die TJs destabilisiert und zu einer Verzögerung der Reassemblierung der TJs nach Ca²⁺-Switch führt [Elias et al., 2009; Kale et al., 2003].

In diesen Untersuchungen konnte wie für die CKII-abhängige Phosphorylierung gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Y398/Y402 die Interaktion zu ZO-1 und ZO-2 vermindert. Möglicherweise ist gerade diese Interaktion das Bindeglied zwischen der Occludin Phosphorylierung sowie der Destabilisierung der Tight Junction Integrität. So haben bereits frühe Untersuchungen gezeigt, dass der Verlust der Interaktion von ZO-1 und Occludin die Assemblierung der TJs stört [Furuse et al., 1994].

Demgegenüber stehen Untersuchungen der PKC η -abhängigen Phosphorylierung von Occludin. In den durchgeführten Experimenten verstärkte die Phosphorylierung von T403/T404 durch PKC η die TJ-Integrität; die Mutation der entsprechenden

Phosphorylierungsstellen zu Alanin führte zu einer Verzögerung der Reassemblierung, die E-Mutante verhielt sich wie der Wildtyp [Suzuki et al., 2009]. Zwar wurde die Interaktion der ZO-Occludin-Bindung nicht analysiert, das Einführen negativer Ladung lässt jedoch ebenfalls eine verminderte ZO-Bindung vermuten und würde damit dieser Theorie widersprechen.

Zudem stellt sich die Frage, warum die T400E/T404E/S408E-Mutante zwar die Reassemblierung stört, dennoch aber an der Membran nachweisbar ist. Eine Erklärung wäre, dass die Integration in die TJ über Dimerisierung mit endogenem Wildtyp-Occludin vermittelt wird. Möglicherweise spielen aber auch andere Interaktionen eine Rolle.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Occludin, selbst wenn es nicht für die *de novo* Formation der Tight Junctions nötig ist [Saitou et al., 2000], so doch zumindest die Integrität der TJs in einer Phosphorylierungs-abhängigen Weise zu regulieren vermag. Welche Signalwege dabei involviert sind und warum einerseits eine Phosphorylierung die Assemblierung beschleunigen, an einer anderen Stelle aber verzögern kann, bleibt zu klären.

5.6.3. Transepithelialer Widerstand

In der Vergangenheit konnte demonstriert werden, dass diverse Signalwege die Permeabilität sowie den transepithelialen Widerstand in unterschiedlichen Epithelien regulieren und dass dabei Tyrosin- [Atkinson and Rao, 2001; Rao et al., 2002] sowie Serin- und Threonin-Phosphorylierungen [Andreeva et al., 2001; Clarke et al., 2000; Hirase et al., 2001; Sakakibara et al., 1997] eine entscheidende Rolle spielen.

Zur Untersuchung, ob die CKII-abhängige Phosphorylierung einen Einfluss auf die Barrierefunktion der TJs hat, wurde die Widerstände mehrerer Klone der stabil transfizierten MDCK-Zellen mittels Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie gemessen.

Bei diesen Messungen konnte für die stabile Transfektion von Wildtyp-Occludin im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen kein signifikanter Einfluss auf den epithelialen, parazellulären oder transzellulären Widerstand festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Überexpression von Occludin *per se* keinen Einfluss auf den Widerstand und damit die Ionenpermeabilität der MDCK C11-Zellen hat. In der Literatur finden sich dazu widersprüchliche Ergebnisse. So wurde in früheren Untersuchungen beispielsweise eine Erhöhung des TER nach Überexpression von Occludin nachgewiesen [Balda et al., 1996; McCarthy et al., 1996]. Allerdings wurde in den verwendeten Zellen trotz der Widerstandszunahme ein Anstieg der Fluxes der parazellulären Marker Mannitol und FITC-Dextran gemessen, ein Indiz für eine Permeabilitätszunahme für mittlere und große Moleküle.

Dieser Widerspruch konnte auch nicht durch die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems geklärt werden [McCarthy et al., 2000].

Im Gegensatz dazu konnte durch den Knock-down von Occludin in MDCK-Zellen sowie durch den Knockout im Mausmodell kein direkter Effekt der Occludin-Expression auf den TER nachgewiesen werden [Saitou et al., 1998; Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005; Yu et al., 2005]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Occludin den Widerstand nicht direkt beeinflusst sondern eher eine indirekte Widerstands-regulierende Funktion besitzt. So konnte nachgewiesen werden, dass die Transfektion von Occludin in BREC-Zellen den TER im Vergleich zu Kontrollzellen nicht erhöht, die Widerstandsänderung nach Stimulation der Zellen mit VEGF jedoch in den Occludin-transfizierten Zellen deutlich stärker ausfällt [Murakami et al., 2009].

Weiterhin entspricht der TER bei Zellkulturen in etwa dem epithelialen Widerstand, also dem Gesamtwiderstand des Epithels, so dass die von McCarthy gemessenen Effekte möglicherweise auf Veränderungen des transzellulären Widerstandes zurückzuführen sind. Das hier angewendete Messsystem erlaubt dagegen die direkte Unterscheidung zwischen dem parazellulären Widerstand (Beitrag der TJs) und dem transzellulären Widerstand (Beitrag der apikalen und basolateralen Membranen zum Gesamtwiderstand).

Die Mutation der CKII-Phosphorylierungsstellen zu Alanin führte ebenfalls zu keiner Veränderung des epithelialen Widerstandes. Demgegenüber zeigten die MDCK-Zellen, die stabil mit der phosphomimetischen Mutante Occludin_{T400E/T404E/S408E} transfiziert waren, eine mehr als dreifache Erhöhung des parazellulären Widerstandes und, resultieren daraus, eine signifikante Erhöhung des epithelialen Widerstandes. Das deutet darauf hin, dass die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin in einer Abdichtung der Tight Junctions resultiert. Dies ist im Einklang mit anderen Untersuchungen, bei denen ein Einfluss von Phosphorylierungen auf die Barriereigenschaften nachgewiesen werden konnte. So führt die Hemmung von PKC η beispielsweise zu einer verringerten Phosphorylierung von Occludin an den Aminosäuren T403/T404, vermindert den TER und erhöht die Permeabilität der Zellen gegenüber Inulin [Suzuki et al., 2009]. Im Gegensatz dazu haben andere Untersuchungen gezeigt, dass die Mutation der c-Src-Phosphorylierungsstellen zu Alanin den transepithelialen Inulin-Flux reduziert [Elias et al., 2009]. Diese Untersuchungen zeigen, dass Phosphorylierungen in dieser Region von Occludin die Barriereigenschaften der Zellen sehr unterschiedlich beeinflussen können. Warum Phosphorylierungen einerseits eine abdichtende Wirkung haben und andererseits zu einer Schwächung der TJs führen, ist bislang unbekannt.

Die zugrunde liegenden Mechanismen müssen in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden.

5.6.4. Proliferation

Tight Junctions stellen hochmolekulare Proteinplattformen dar, die mit zahlreichen Signalmolekülen assoziieren. Viele der junctional assoziierten Proteine sind an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Polarisation epithelialer Zellen beteiligt [Matter et al., 2005]. Darüber hinaus wurde für einzelne TJ-Komponenten ein direkter Einfluss auf die Proliferation nachgewiesen. So reguliert ZO-1 beispielsweise die Proliferation in MDCK-Zellen über den Y-box Transkriptionsfaktor ZONAB [Balda et al., 2003]. Symplekin, eine weitere TJ-Komponente, scheint in diesem Prozess zu kooperieren [Kavanagh et al., 2006]. In ähnlicher Weise interagiert ZO-2 mit Transkriptionsfaktoren die Proliferation und Differenzierung regulieren, wie Jun, Fos und C/EBP (CCAT-enhancer binding protein) [Betanzos et al., 2004]. Parallel kann ZO-2 die Wnt/ β -Catenin vermittelte Transkription von Cyclin D1 (essentiell für Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus) sowie dessen proteosomalen Abbau unterdrücken und so die Proliferation inhibieren [Tapia et al., 2009].

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Occludin ebenfalls in proliferativen und apoptotischen Prozessen involviert ist. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die stabile Transfektion der Occludin-Konstrukte einen Einfluss auf die Proliferation der MDCK-Zellen hat. Dabei konnte für die mit Wildtyp-Occludin transfizierten MDCK-Zellen im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen kein Unterschied in der Proliferationsrate nachgewiesen werden. Dies ist im Einklang mit Untersuchungen an HeLa-Zellen, in denen die Occludin-Expression *per se* kein Effekt auf die Proliferation der Zellen ausübt [Osanai et al., 2006]. Demgegenüber stehen Untersuchungen an kultivierten Hepatocyten, in denen Occludin dringend erforderlich für das Überleben der Zellen ist. Der Verlust von Occludin führt dabei zu einer Verminderung von Überlebens-Signalen durch Herabregulation von MAPK- und PKB/Akt-Signalwegen [Murata et al., 2005]. Diese Diskrepanzen sind möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Zellsystem und die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bzw. Ansätze zurückzuführen.

Die Untersuchung der Proliferationsraten der, mit der Phosphorylierungs-defizienten T400A/T404A/S408A- bzw. der phosphomimetischen T400E/T404E/S408E-Mutante transfizierten Zellen ergab ebenfalls keine signifikante Veränderung in der Proliferation im

Vergleich zu mit Wildtyp-Occludin transfizierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen ausübt.

Ein weiterer interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die potentielle apoptotische Wirkung von Occludin. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Occludin in einer Vielzahl von Tumorzellen zu einer Sensitivierung der Zellen für Apoptose-induzierende Antigene führt [Osanai et al., 2006]. Zudem verändern enteropathische *E. coli*-Bakterien die Lokalisation von Occludin in epithelialen T84 Zellen und induzieren Caspase-abhängig Apoptose [Flynn and Buret, 2008]. Weiterhin wurde gezeigt, dass nicht-junktionales Occludin mit Fas und FADD (Fas associated protein with death domain) im Todeskomplex DISC (death-inducing signaling complex) interagieren kann und dadurch die Aktivierung der Caspase-3 und -8 initiiert [Beeman et al., 2009].

Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant herauszufinden, ob und wenn ja, inwieweit die CKII-abhängige Phosphorylierung von Occludin Apoptose-induzierende Effekte beeinflusst.

6. Zusammenfassung

Die Integrität der Tight Junctions (TJs) sowie die Aufrechterhaltung der transepithelialen Barriere ist entscheidend für die Funktion epithelialer und endothelialer Zellschichten. TJs regulieren die Barriere für den parazellulären Transport, sichern die Polarität der Zellen und integrieren zahlreiche Signalwege. Das Tetraspan-Transmembranprotein Occludin ist eine der Hauptkomponenten dieser Zell-Zellverbindungen und spielt eine fundamentale Rolle bei der molekularen Organisation und Funktion der TJs. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Phosphorylierungen der TJ-Komponenten eine grundlegende Bedeutung bei der Regulation der TJs zukommt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, Kinasen zu identifizieren, die Occludin phosphorylieren, die entsprechenden Phosphorylierungsstellen zu identifizieren und die Auswirkungen auf die TJs zu studieren.

Zunächst konnte in Co-Immunpräzipitationsstudien gezeigt werden, dass die Kinasen CKI und CKII an Occludin binden. Diese Interaktion konnte über *in vitro*-Assoziationsexperimente anhand rekombinant exprimierter GST-Fusionsproteine der cytoplasmatischen Domänen von Occludin bestätigt werden.

Anschließend wurden die Aminosäuren S25, S277, S302, T305, S313, S326, S327, S341 und T403 über *in vitro*-Phosphorylierung und massenspektrometrische Analysen als potentielle Phosphorylierungsstellen der CKI-abhängigen Phosphorylierung identifiziert. Durch Mutagenese dieser Aminosäuren und anschließende *in vitro*-Phosphorylierung konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass es sich bei diesen Aminosäuren um physiologisch relevante Phosphorylierungsstellen handelt.

Für CKII konnten dagegen die Aminosäuren T400, T404 und S408 als Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Aufeinanderfolgende Mutagenese dieser Aminosäuren und *in vitro*-Kinasierungsexperimente zeigte, dass der CKII-abhängigen Phosphorylierung ein sequentieller Mechanismus zugrunde liegt, bei dem die Phosphorylierung von S408 die Phosphorylierung an T400/T404 verstärkt.

Zur funktionellen Charakterisierung der CKII-abhängigen Phosphorylierung wurden jeweils eine phosphorylierungsdefiziente T400A/T404A/S408A- sowie eine phosphomimetische T400E/T404E/S408E-Mutation generiert und diese auf Bindung zu den Zonula occludens-Proteinen untersucht. Über *in vitro*-Assoziationsexperimente und Co-Immunpräzipitationsexperimente konnte kein Einfluss der Phosphorylierungsstellen auf die Bindung zu ZO-1 festgestellt werden, während die T400E/T404E/S408E-Mutation die Bindung zu ZO-2 destabilisiert.

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der CKII-abhängigen Phosphorylierung wurden MDCK C11-Zellen stabil mit der T400A/T404A/S408A- sowie der T400E/T404E/S408E-Mutante transfiziert. Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte, dass die Lokalisation der Konstrukte nicht von der Mutation der CKII-Phosphorylierungsstellen abhängt. Über Ca^{2+} -Switch-Experimenten konnte jedoch für die T400E/T404E/S408E-Mutante eine Verzögerung der Assemblierung der TJs festgestellt werden. Zusätzlich konnte in 2-Wege Impedanzmessungen nachgewiesen werden, dass diese Mutation zu einer Erhöhung des parazellulären Widerstandes führt.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass durch die CKII-abhängige Phosphorylierung die Interaktion von Occludin mit den ZO-Proteinen moduliert und die Barrierefunktion der TJs beeinflusst werden kann.

7. Summary

The integrity of the Tight Junctions (TJs), as well as the maintenance of the transepithelial barrier is critical to the function of epithelial and endothelial cell sheets. Besides regulating the barrier for the paracellular transport, TJs constitute to the polarity of the cells and integrate various signaling pathways. The tetraspan transmembrane protein Occludin is one of the main components within these cell-cell-contact sites and plays a fundamental role in the molecular organization and function of the TJs. In addition recent studies revealed that phosphorylation events critically regulate the TJs. Therefore, the aim of this study was to detect kinases that act on occludin, to identify the phosphorylation sites and to study the physiological consequences of these phosphorylations.

Using a co-immunoprecipitation assay it was shown that the kinases CKI and CKII bind to occludin. The direct interaction was confirmed in a pull-down assay with recombinant expressed GST-fusion proteins of the cytoplasmic domains of occludin.

In vitro phosphorylation followed by MALDI/TOF analysis identified the aminoacids S25, S277, S302, T305, S313, S326, S327, S341 and T403 as potential CKI phosphorylation sites. Unfortunately, using site-directed mutagenesis and subsequent *in vitro* phosphorylation, none of these residues could be finally confirmed as specific CKI phosphosites.

In constrats, the aminoacids T400, T404 and S408 have been identified as exclusive CKII phosphorylation sites. Successive mutagenesis and *in vitro* kinase assays revealed a sequential phosphorylation process in which the phosphorylation of S408 elevates the phosphorylation level of T400/T404.

To study the impact of the CKII-dependent phosphorylation on binding of occludin to ZO-proteins, a phosphorylation-deficient T400A/T404A/S408A- as well as a phosphomimetic T400E/T404E/S408E-occludin mutant was generated. *In vitro* association assays and Co-IP suggest that the phosphorylation of these residues significantly destabilizes the interaction between occludin and ZO-2, whereas the ZO-1-occludin interaction is unaffected.

Concerning the physiological effects of the CKII-dependent phosphorylation, MDCK C11 cells, stably expressing the occludin wt and mutant constructs, were generated. Confocal immunofluorescence showed that the localization of the occludin constructs was not changed within the different clones. In contrast, during calcium induced assembly of the TJs, the insertion of the occludin T400E/T404E/S408E mutant into the intercellular junctions appeared to be delayed in comparison to wt-occludin. Moreover, the transepithelial resistance

of MDCK C11 cells as measured by two-path impedance spectroscopy is increased when T400/T404/S408 was mutated to alanine.

Taken together, these data suggests that phosphorylation of occludin by CKII alters binding to ZO-proteins and in consequence modulates TJ function.

8. Literatur

- Abe K, Takeichi M (2008): EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13-9.
- Andras IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M (2007): The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.*
- Andreeva AY, Krause E, Muller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI (2001): Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem* 276:38480-6.
- Andreeva AY, Piontek J, Blasig IE, Utepbergenov DI (2006): Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 38:222-33.
- Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS (2008): Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F867-76.
- Atkinson KJ, Rao RK (2001): Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1280-8.
- Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA (2001): JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276:2733-41.
- Balda MS, Garrett MD, Matter K (2003): The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160:423-32.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K (1996): Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134:1031-49.
- Bazzoni G (2003): The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15:525-30.
- Bazzoni G, Dejana E (2004): Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869-901.
- Beau I, Cotte-Laffitte J, Amsellem R, Servin AL (2007): A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional

- tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. *J Virol* 81:8579-86.
- Beeman NE, Baumgartner HK, Webb PG, Schaack JB, Neville MC (2009): Disruption of occludin function in polarized epithelial cells activates the extrinsic pathway of apoptosis leading to cell extrusion without loss of transepithelial resistance. *BMC Cell Biol* 10:85.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-3.
- Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, Gonzalez-Mariscal L (2004): The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 292:51-66.
- Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E, Krause G, Gast K, Kolbe M, Piontek J (2006): On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci* 63:505-14.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-62.
- Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA (2000): Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11:849-62.
- Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B (2002): Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 13:1227-37.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N (2008): Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778:588-600.
- Citi S, Sabanay H, Kendrick-Jones J, Geiger B (1989): Cingulin: characterization and localization. *J Cell Sci* 93 (Pt 1):107-22.
- Clarke H, Soler AP, Mullin JM (2000): Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J Cell Sci* 113 (Pt 18):3187-96.
- Cohen P, Frame S (2001): The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:769-76.
- Cordenonsi M, Mazzon E, De Rigo L, Baraldo S, Meggio F, Citi S (1997): Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J Cell Sci* 110 (Pt 24):3131-9.

- Cordenonsi M, Turco F, D'Atri F, Hammar E, Martinucci G, Meggio F, Citi S (1999): Xenopus laevis occludin. Identification of in vitro phosphorylation sites by protein kinase CK2 and association with cingulin. *Eur J Biochem* 264:374-84.
- Daugherty RL, Gottardi CJ (2007): Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 22:303-9.
- Dejana E (2004): Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261-70.
- DeMaio L, Rouhanizadeh M, Reddy S, Sevanian A, Hwang J, Hsiai TK (2006): Oxidized phospholipids mediate occludin expression and phosphorylation in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H674-83.
- Dörfel MJ, Huber O (2008): CSNK1A1 (casein kinase 1, alpha 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
- Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D (2003): The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 116:3879-91.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D (2001): The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J* 20:3738-48.
- Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, Turner JR, Naren A, Desiderio DM, Rao R (2009): Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J Biol Chem* 284:1559-69.
- Fanning AS, Anderson JM (2009): Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165:113-20.
- Farshori P, Kachar B (1999): Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *J Membr Biol* 170:147-56.
- Flynn AN, Buret AG (2008): Caspases-3, -8, and -9 are required for induction of epithelial cell apoptosis by enteropathogenic E. coli but are dispensable for increased paracellular permeability. *Microb Pathog* 44:311-9.
- Forster C (2008): Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130:55-70.

- Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T, Tsukita S (1996): Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):429-35.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998): Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-50.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993): Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-88.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1994): Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127:1617-26.
- Gavert N, Ben-Ze'ev A (2007): beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 102:820-8.
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008): Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778:729-56.
- Gu JM, Lim SO, Park YM, Jung G (2008): A novel splice variant of occludin deleted in exon 9 and its role in cell apoptosis and invasion. *Febs J* 275:3145-56.
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
- Hartsock A, Nelson WJ (2008): Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778:660-9.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR (1998): ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141:199-208.
- Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y (2003): JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol* 23:4267-82.
- Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM (2001): Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 276:10423-31.
- Hirata K, Ishida T, Penta K, Rezaee M, Yang E, Wohlgemuth J, Quertermous T (2001): Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 276:16223-31.

- Huang HD, Lee TY, Tzeng SW, Horng JT (2005): KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res* 33:W226-9.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2005): Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171:939-45.
- Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S (2008): Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19:4687-93.
- Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L (2002): Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* 274:138-48.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999a): Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147:1351-63.
- Itoh M, Morita K, Tsukita S (1999b): Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274:5981-6.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S (2001): Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154:491-7.
- Jin T, George Fantus I, Sun J (2008): Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* 20:1697-704.
- Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK (2003): Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem Biophys Res Commun* 302:324-9.
- Kavanagh E, Buchert M, Tsapara A, Choquet A, Balda MS, Hollande F, Matter K (2006): Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J Cell Sci* 119:5098-105.
- Kawedia JD, Jiang M, Kulkarni A, Waechter HE, Matlin KS, Pauletti GM, Menon AG (2008): The protein kinase A pathway contributes to Hg²⁺-induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 326:829-37.
- Keon BH, Schafer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW (1996): Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134:1003-18.
- Klose J, Kobalz U (1995): Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16:1034-59.

- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M (2005): The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17:675-89.
- Krug SM, Fromm M, Gunzel D (2009): Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97:2202-11.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Li Y, Fanning AS, Anderson JM, Lavie A (2005): Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface. *J Mol Biol* 352:151-64.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002): Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-47.
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA (2000): Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113 (Pt 13):2363-74.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998): Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-27.
- Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS (2005): Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17:453-8.
- McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Skare IB, Lynch RD, Schneeberger EE (2000): Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3387-98.
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996): Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2287-98.
- McKenzie JA, Riento K, Ridley AJ (2006): Casein kinase I epsilon associates with and phosphorylates the tight junction protein occludin. *FEBS Lett* 580:2388-94.
- Meggio F, Pinna LA (2003): One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* 17:349-68.
- Mese G, Richard G, White TW (2007): Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127:2516-24.

- Miyoshi J, Takai Y (2008): Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778:670-91.
- Muller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G (2005): The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem* 280:3747-56.
- Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA (2009): Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* 284:21036-46.
- Murata M, Kojima T, Yamamoto T, Go M, Takano K, Osanai M, Chiba H, Sawada N (2005): Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res* 310:140-51.
- Nelson WJ, Nusse R (2004): Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483-7.
- Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL, 3rd, Sontag E (2002): Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* 158:967-78.
- Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ (2000): The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 275:29816-22.
- Olivera D, Knall C, Boggs S, Seagrave J (2009): Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium. *Exp Toxicol Pathol*.
- Osanai M, Murata M, Nishikiori N, Chiba H, Kojima T, Sawada N (2006): Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. *Cancer Res* 66:9125-33.
- Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD (2000): Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275:19139-45.
- Pinna LA, Allende JE (2009): Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: an ugly duckling in the kinome pond. *Cell Mol Life Sci* 66:1795-9.
- Raimondi F, Santoro P, Barone MV, Pappacoda S, Barretta ML, Nanayakkara M, Apicella C, Capasso L, Paludetto R (2008): Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G906-13.

- Rajasekaran SA, Barwe SP, Gopal J, Ryazantsev S, Schneeberger EE, Rajasekaran AK (2007): Na-K-ATPase regulates tight junction permeability through occludin phosphorylation in pancreatic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G124-33.
- Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A (2002): Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 368:471-81.
- Rasband WS (1997-2009): ImageJ.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Friedman TB (2006): Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79:1040-51.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397-408.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11:4131-42.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S (1997): Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137:1393-401.
- Sallee JL, Burridge K (2009): DEP-1 regulates phosphorylation of tight junction proteins and enhances barrier function of epithelial cells. *J Biol Chem*.
- Sambrook J, Russel D (2001): *Molecular Cloning*.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1992): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 10:104-8.
- Schlosser A, Vanselow JT, Kramer A (2005): Mapping of phosphorylation sites by a multi-protease approach with specific phosphopeptide enrichment and NanoLC-MS/MS analysis. *Anal Chem* 77:5243-50.
- Schmidt A, Utepbergenov DI, Mueller SL, Beyermann M, Schneider-Mergener J, Krause G, Blasig IE (2004): Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci* 61:1354-65.
- Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M (2005): Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1669:34-42.

- Seth A, Sheth P, Elias BC, Rao R (2007): Protein Phosphatases 2A and 1 Interact with Occludin and Negatively Regulate the Assembly of Tight Junctions in the CACO-2 Cell Monolayer. *J Biol Chem* 282:11487-98.
- Smales C, Ellis M, Baumber R, Hussain N, Desmond H, Staddon JM (2003): Occludin phosphorylation: identification of an occludin kinase in brain and cell extracts as CK2. *FEBS Lett* 545:161-6.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- St-Denis NA, Litchfield DW (2009): Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol Life Sci* 66:1817-29.
- Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV (2006): Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. *J Biol Chem* 281:8379-88.
- Sundstrom JM, Tash BR, Murakami T, Flanagan JM, Bewley MC, Stanley BA, Gonsar KB, Antonetti DA (2009): Identification and analysis of occludin phosphosites: a combined mass spectrometry and bioinformatics approach. *J Proteome Res* 8:808-17.
- Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R (2009): PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:61-6.
- Tapia R, Huerta M, Islas S, Avila-Flores A, Lopez-Bayghen E, Weiske J, Huber O, Gonzalez-Mariscal L (2009): Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Mol Biol Cell* 20:1102-17.
- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, Bauer HC, Bauer H (2002): The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem* 277:10201-8.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001): Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-93.
- Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S (2008): Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27:6930-8.
- Wang Z, Mandell KJ, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A (2005): The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* 24:4412-20.

- Weis WI, Nelson WJ (2006): Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* 281:35593-7.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR (1999): Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274:35179-85.
- Wong V (1997): Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* 273:C1859-67.
- Wong V, Gumbiner BM (1997): A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136:399-409.
- Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X (2008): GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7:1598-608.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005): Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123:889-901.
- Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T (2008): Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. *Am J Pathol*.
- Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (2005): Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1231-41.
- Zheng B, Cantley LC (2007): Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:819-22.
- Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M (1993): Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 120:477-83.

9. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(v/w)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen
Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junctions
Amp	Ampicillin
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
CaM-Kinase	<i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase</i>
CAR	coxsackie and adenovirus receptor
CKI	casein kinase I
CKII	casein kinase II
Cld.	Claudin
C-term.	C-terminal
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	2`,3`-Didesoxynukleotid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSD	Sodiumdodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESAM	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
f. l.	<i>full length</i> ; Volllängen
FKS	fetales Kälberserum
GSK3β	Glycogensynthase Kinase-3β
GST	Glutathion-S-Transferase
GuK	Guanylatkinase

h	<i>hours</i> ; Stunde
HA	Hemagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
LC	<i>low calcium</i> ; niedrig Calcium
LEF	<i>lymphocyte enhancer factor</i>
LPA	<i>lysophosphatic acid</i> ; Lysophosphatidylsäure
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MBP	<i>maltose binding protein</i> ; Maltosebindungsprotein
MDCK	Madin-Darbi canine kidney
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Minute
NC	normal Calcium
N-term.	N-terminal
Occ	Occludin
ON	Oligonukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/disc-large/Zonula occludens-1
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat
PNK	Polynukleotid Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat

SH3	Src-homology-3
t	<i>time</i> ; Zeit
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	<i>transepithelial resistance</i> ; transepithelialer Widerstand
TJ	Tight Junction
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TST	Tris-Saline-Tween
U	<i>units</i> , Einheiten
UIM	<i>ubiquitin interacting motif</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot
ZO	<i>zonula occludens</i>

Curriculum Vitae

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

Publikationen

Dörfel MJ, Westphal JK, Krug SM, Fromm M, Huber O: CKII-dependent phosphorylation of occludin attenuates its interaction with ZO-2 and regulates tight junction integrity (in preparation)

Westphal JK, **Dörfel MJ**, Krug SM, Cording JD, Piontek J, Blasig IE, Tauber R, Fromm M, Huber O (2010): Tricellulin forms homomeric and heteromeric complexes in tight junctions. CMLS

Urban R, Bachran C, Mewis D, **Dörfel MJ**, Schellmann N, Bachran D, Fuchs H: Quantitation of Saporin- and Ricin-mediated Adenine Release. Anal Bioanal Chem (in progress)

Dörfel MJ, Westphal JK, Huber O (2009): Differential phosphorylation of occludin and tricellulin by CK2 and CK1. Ann N Y Acad Sci 1165:69-73.

Dörfel MJ, Huber O (2008): CSNK1A1 (casein kinase 1, alpha 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.

Bescheinigung

gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Funktion des Tight Junction-Proteins Occludin“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich meine Dissertation, im Falle der Ablehnung, nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden werde.

Die in dieser Dissertation verwendeten geschützten Warenzeichen sind innerhalb des laufenden Textes nicht immer als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen der Kennzeichnung kann also nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Max J. Dörfel

Berlin, April 2010