

Interaktion des humanen Tight Junction Proteins ZO-1
mit dem Ras-Effektor AF6 und
Untersuchungen am Zellwandprotein Aga2 von
Saccharomyces cerevisiae



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Gerald Bäuml

aus Regensburg

Februar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 12.02.2008

Kolloquium am: 23.04.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Herbert Tschochner

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

2. Gutachter: PD Dr. Wolfram Gronwald

3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die Proteine ZO-1 und AF6	8
1.1.1	Aufbau und Funktion von Tight Junctions	8
1.1.2	Das Tight Junction Protein ZO-1	11
1.1.3	Der Ras-Effektor AF6	13
1.1.4	Interaktion von ZO-1 und AF6	15
1.2	Das Hefe-Zellwandprotein Aga2	16
1.3	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	20
2.1.3	Puffer und Lösungen	20
2.1.4	Nährmedien	23
2.1.5	Enzyme und andere Proteine	25
2.1.6	Bakterienstämme	25
2.1.7	Plasmide	25
2.1.8	Standards	26
2.1.9	Fertigkits	26
2.1.10	Chromatographiesäulen	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	27
2.2.1.2	Präparation von Nukleinsäuren	27
2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.1.5	Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA	29
2.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	29

2.2.1.8	Herstellung von Glycerinkulturen	30
2.2.1.9	Gerichtete Mutagenese	30
2.2.1.10	Reverse Transkription	30
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.2.1	<i>In Vivo</i> Expression von Proteinen	31
2.2.2.1.1	Anzucht einer Expressionskultur	31
2.2.2.1.2	Zellaufschluss	32
2.2.2.2	<i>In Vitro</i> Expression von Proteinen	33
2.2.2.2.1	Lysatherstellung	34
2.2.2.2.2	Expression im Batchverfahren	34
2.2.2.3	Verfahren zur Proteinreinigung	35
2.2.2.3.1	Affinitätschromatographie	35
2.2.2.3.2	Gelfiltration	36
2.2.2.4	Expression von ¹⁵ N-markierten Proteinen	37
2.2.3	Analytische Methoden	37
2.2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	37
2.2.3.2	Proteinfällung	38
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.3.4	Western-Blotting	39
2.2.3.5	Massenspektrometrie	39
2.2.3.6	N-terminale Ansequenzierung	40
2.2.3.7	Crosslink-Assays	40
2.2.3.8	Analytische Gelfiltration	41
2.2.3.9	Pulldown-Assays	41
2.2.3.10	Fluoreszenzspektroskopie	41
2.2.4	NMR-Spektroskopie	42
2.2.4.1	¹ H-Experimente	42
2.2.4.2	¹⁵ N-TROSY-HSQC-Experimente	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Untersuchungen am α-Agglutinin	44
3.1.1	Klonierung des Expressionskonstrukts	44
3.1.2	<i>In vivo</i> und <i>In vitro</i> Expression der Konstrukte	45

3.1.2.1	Expression und Präparation von Aga2	45
3.1.2.2	Co-Präparation von Aga1 und Aga2	46
3.1.2.3	Expression und Präparation der Mutanten Aga2-F und Aga2-FSS	49
3.1.3	Analytik der Expressionsprodukte	51
3.1.3.1	Massenspektrometrie und N-terminale Ansequenzierung	51
3.1.3.2	Sekundärstrukturvorhersage von Aga2	51
3.1.3.3	Analytische Gelfiltration	52
3.1.3.4	NMR-Spektroskopie	53
3.2	Die Interaktion von ZO-1 und AF6	55
3.2.1	Klonierung von ZO-1 Domänen	55
3.2.2	Expression und Präparation von AF6- und ZO-1-Domänen	56
3.2.2.1	AF6-Domänen	56
3.2.2.2	Das ZO-1-Konstrukt SH3-I	57
3.2.2.3	Das ZO-1-Konstrukt SG	59
3.2.2.4	Das ZO-1-Konstrukt P2P3	61
3.2.2.5	Das ZO-1-Konstrukt P3	62
3.2.2.6	Das ZO-1-Konstrukt P2 ⁺	64
3.2.2.7	Das ZO-1-Konstrukt ZO1-k	66
3.2.3	Interaktionsstudien von ZO-1 und AF6	68
3.2.3.1	Pulldown-Assays	68
3.2.3.2	Crosslink-Assays	70
3.2.3.2.1	Protein-DNA-Crosslink	70
3.2.3.2.2	Protein-Protein-Crosslink	71
3.2.3.3	Analytische Gelfiltrationen	73
3.2.3.4	Fluoreszenz-Titration	75
3.2.3.5	NMR-Experimente	77
3.2.3.5.1	Titrationsexperimente	77
3.2.3.5.2	Auswertung der NMR-Daten	83
4	Diskussion	92
4.1	Untersuchungen am Hefe-Zellwandprotein Aga2	92
4.1.1	Eigenschaften von Aga2	92
4.1.2	Auswirkungen der Co-Präparation von Aga1 und Aga2	94

4.1.3	Auswirkungen der gerichteten Mutagenese von Aga2	95
4.2	Die Interaktion von ZO-1 und AF6	98
4.2.1	Klonierung und Präparation der Proteinkonstrukte	98
4.2.1.1	Die N-terminale Hälfte von ZO-1	99
4.2.1.2	Die ZO-1 Domänen SH3 und GuK	100
4.2.1.3	Die PDZ-Domänen von ZO-1	102
4.2.2	Bewertung der Resultate aus den Interaktionsexperimenten	103
4.2.2.1	Pulldown-Assays	103
4.2.2.2	Crosslink-Assays	104
4.2.2.3	Analytische Gelfiltration	105
4.2.2.4	Fluoreszenztitration	106
4.2.2.5	NMR-Titrationsexperimente	106
4.2.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Funktion von ZO-1 und AF6 im zellulären Kontext	110
4.2.4	Perspektiven	111
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	115
7	Anhang	125

1 Einleitung

Ein wesentliches Charakteristikum des Lebens ist die Konstanzhaltung eines von der Umgebung verschiedenen inneren Milieus (Claude Bernard).

Dies wird bei Eukaryonten im Kleinen durch die Membranen der Zellen gewährleistet und im Großen durch eine spezielle Gewebeart, den Epithelien. Diese Zellschichten kleiden alle inneren und äußeren Körperoberflächen aus und schaffen so mehr oder weniger isolierte Kompartimente. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, besitzen Epithelien zwei grundlegende Eigenschaften. Zum einen regulieren sie durch ihre Polarität den transepithelialen Stoff- und Wassertransport, zum anderen dienen sie als Barriere, um eine parazelluläre Diffusion zu verhindern [Farquhar et al, 1963 und van Meer et al., 1986]. Beide Eigenschaften werden durch Proteinkomplexe gebildet, die alle Epithelzellen miteinander verbinden und als Tight Junctions bezeichnet werden.

Durch welchen Mechanismus Epithel-, ebenso wie Endothelzellen, eine Permeabilitätsbarriere bilden ist eine fundamentale Frage in der Zellbiologie. Ein Aufbrechen dieser Barriere ist Ursache oder Begleiterscheinung einer Reihe von Krankheiten, wie zum Beispiel Lungenödem, Nierenerkrankungen, Psoriasis oder der Metastasierung von Tumoren. Eine Gemeinsamkeit all dieser Erkrankungen ist, dass die verstärkte Permeabilität mit einem erhöhten Level an Wachstumsfaktoren einhergeht. So stimuliert ein erhöhter Spiegel an VEGF (vascular endothelial growth factor) in den Augen von Diabetes-Patienten die vaskuläre Permeabilität, was in der Folge zu Sehstörungen und Erblindung führt. Der Mechanismus, welcher sich dahinter verbirgt, ist jedoch nach wie vor weitgehend unbekannt. Tight Junctions spielen zudem eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke [Rubin et al., 1999]. Auch hier ist das Aufbrechen von Tight Junctions mit vielen Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie Schlaganfall, HIV-Enzephalitis, Alzheimer Demenz, Multipler Sklerose und bakterieller Meningitis verbunden [Leech et al., 2007].

Diese medizinische Relevanz macht die Notwendigkeit einer möglichst detaillierten Kenntnis der molekularen Vorgänge und der daran beteiligten Proteine deutlich. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Ansätze verfolgt.

Der erste Ansatz behandelte die putative Interaktion zweier Proteine, dem Tight Junction Protein Zonula Occludens 1 (ZO-1) und dem Protein Afadin (AF6), welches

einen Effektor in der Ras-Signalkaskade darstellt. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine entscheidende Schnittstelle zwischen der intrazellulären Weiterleitung von Wachstumssignalen und der Ausbildung und dem Erhalt von Zell-Zell-Verbindungen handelt.

Des Weiteren sollten anhand eines Modellproteins durch die Analyse dessen dreidimensionaler Struktur Erkenntnisse über den Mechanismus der Zell-Zell-Erkennung und -Bindung gewonnen werden. Um eine möglichst ursprüngliche Form der Zell-Zell-Erkennung zu untersuchen, wurde dazu das α -Agglutinin der Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* gewählt.

1.1 Die Proteine ZO-1 und AF6

1.1.1 Aufbau und Funktion von Tight Junctions

Die Integrität epithelialer Zellschichten, die multizelluläre Organismen vor der äußeren Umgebung schützen, wird durch interzelluläre Verbindungen ermöglicht. Diese umfassen Adherens Junctions, Gap Junctions und Tight Junctions (siehe Abb. 1).

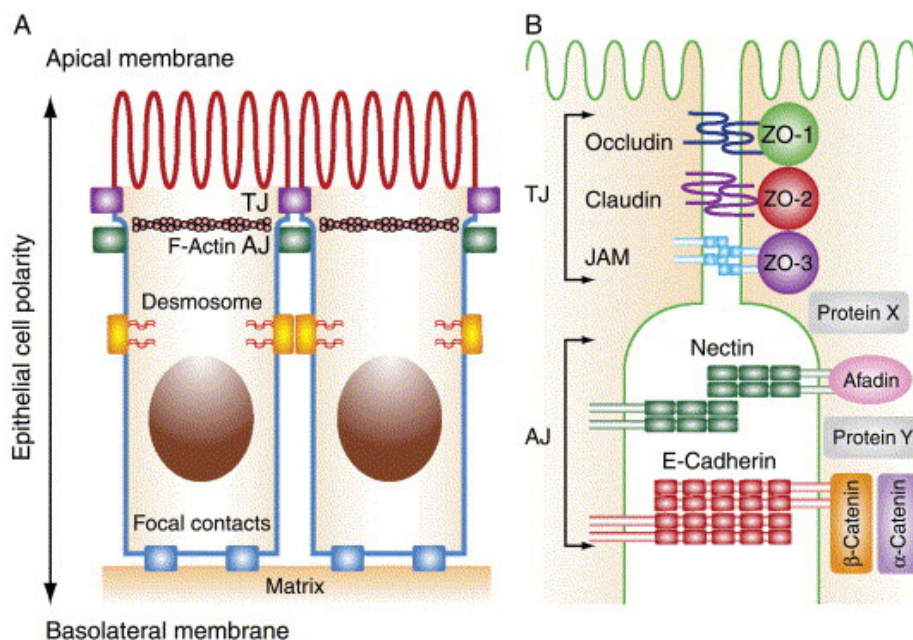


Abb. 1: Schematische Darstellung von Zell-Zell-Verbindungen. **A:** Epithelzellen; dargestellt ist die Polarität der Zellen sowie die relative Anordnung der interzellulären Verbindungen. **B:** Vergrößerte Darstellung der Tight Junctions (TJ) und Adhärenz Junctions (AJ) mit den jeweils wichtigsten Komponenten. [Miyoshi & Takai, 2005]

Adherens Junctions sind stabile Zell-Zell-Verbindungen, welche überwiegend aus Cadherinen bestehen. Sie kommen hauptsächlich in Geweben vor, die starken mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, wie zum Beispiel im Herzmuskel oder in der Haut.

Gap Junctions setzen sich aus Connexinen zusammen, welche Poren bilden und so benachbarte Zellen zum Austausch von Ionen und anderen kleinen Molekülen miteinander verbinden.

Der apikale Teil des Zellbindungs-Komplexes, die Tight Junction, bildet einen kontinuierlichen Ring um die gesamte Zelle, welcher zum einen als Barriere des parazellulären Transports dient, zum anderen die Polarität der Zelle aufrechterhält. Auf der cytoplasmatischen Seite formt die Tight Junction so genannte Plaques aus einer Vielzahl Tight Junction-assoziiierter Proteine.

Der Aufbau der Tight Junction besteht somit aus zwei Proteinklassen. Die Transmembranproteine, welche durch Interaktion mit den komplementären Proteinen benachbarter Zellen die eigentliche Zell-Zell-Verbindung herstellen, und die Tight Junction-assoziierten Proteine, welche auf der cytoplasmatischen Seite liegen und durch Bindung an die Transmembranproteine und den Kontakt zum Cytoskelett die strukturelle Verankerung der Tight Junctions gewährleisten.

Zur Gruppe der integralen Membranproteine gehören das Occludin, die Familie der Claudine und das Junctional Adhesion Molecule (JAM). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung einer Tight Junction.

Occludin besitzt vier membrandurchspannende Domänen sowie intrazelluläre N- und C-Termini. Die beiden extrazellulären Domänen sind als Schleifen strukturiert, welche direkt an die Schleifen des Occludins der benachbarten Zelle binden [Furuse et al., 1994].

Bei den Claudinen handelt es sich um eine Proteinfamilie mit bislang 24 bekannten Mitgliedern. Genau wie das Occludin besitzen sie vier Transmembrandomänen.

Man vermutet, dass die unterschiedlichen Expressionsmuster der Claudine in den verschiedenen Geweben für Unterschiede in der Durchlässigkeit der Epithelien verantwortlich sind. So werden beispielsweise Claudin-2 bis Claudin-5 in den verschiedenen Darmabschnitten unterschiedlich stark exprimiert [Rahner et al., 2001], während Claudin-7 und Claudin-8 vor allem in der Lunge und in der Niere vorkommen [Morita et al., 1999].

Das Junctional Adhesion Molecule (JAM) befindet sich in der Tight Junction unterhalb der Occludine und Claudine [Martin-Padura et al., 1998]. Im Gegensatz zu diesen besitzt es jedoch nur eine membrandurchspannende Domäne. Da sein extrazellulärer Teil immunglobulinartige Domänen besitzt, wird es zu der Immunglobulin-Superfamilie gezählt. Seine Funktion vermutet man in der Einleitung der Tight Junction-Ausbildung nach Formation primärer Adhäsionskomplexe benachbarter Zellen [Takai et al., 2003].

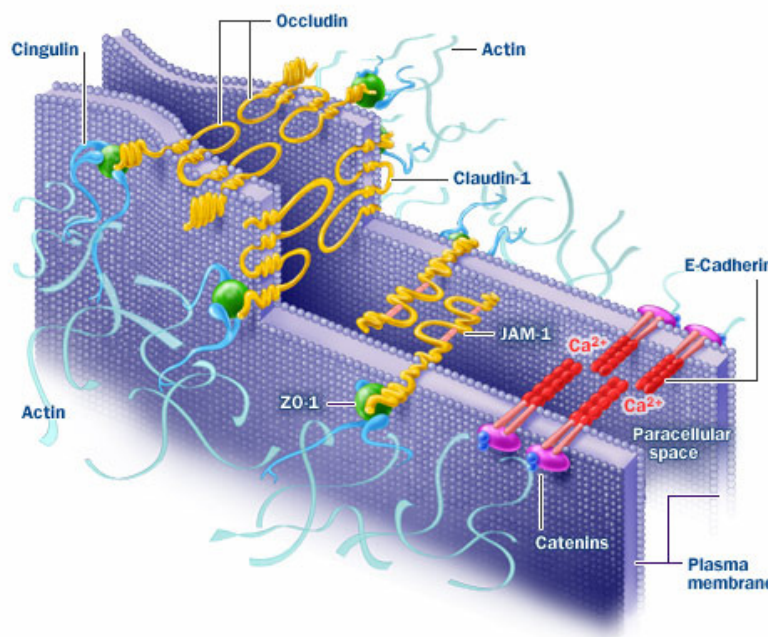


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Tight Junction anhand eines Ausschnitts benachbarter Zellmembranen (blau). ZO-1 ist grün dargestellt, die integralen Membranproteine Occludin, Claudin-1 und JAM-1 sind gelb dargestellt. Hellblaue Filamente stellen Aktin dar. Zum Vergleich ist ein Teil einer Adhärenz Junction dargestellt, mit E-Cadherin in rot und magentafarbenen Catenin. [www.nastech.com]

Zu den Tight Junction-assoziierten Proteinen, welche intrazellulär vorliegen und somit keine Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle im eigentlichen Sinn sind, zählen unter anderem die Zonula Occludens Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3, Symplekin, Cingulin und ZONAB.

ZO-1, ZO-2 und ZO-3 gehören zur Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK). Diesen Proteinen wird eine große Rolle in der Ausbildung und Erhaltung von Membrandomänen zugeschrieben [Itoh et al., 1993]. Sie zeichnen sich durch ein charakteristisches Muster an konservierten Bindemotiven aus. So besitzen

sie drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne und eine nicht-katalytische Guanylatkinase-Domäne, die für den Namen dieser Proteinfamilie verantwortlich ist [Woods et al., 1993].

Obwohl diese nicht-integralen Membranproteine durch Elektronenmikroskopie und Immunofluoreszenz in unmittelbarer Umgebung der Tight Junctions lokalisiert wurden [Stevenson & Keon, 1998], ist ihr Beitrag zu Struktur und Funktion der Tight Junctions weitgehend unbekannt.

Neuere Studien zeigen zudem, dass ein Teil dieser cytoplasmatischen Moleküle mit der Regulation von Vorgängen wie Zellteilung, Zellproliferation und Zellpolarität in Verbindung gebracht werden kann, was sie zu begehrten Objekten aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen macht.

1.1.2 Das Tight Junction Protein ZO-1

ZO-1 (Zonula Occludens 1) war, wie der Name schon vermuten lässt, das erste Tight Junction-assoziierte cytosolische Protein, das als solches identifiziert wurde [Stevenson et al., 1986]. Mittlerweile wurde es außerdem in Adherens Junctions gefunden, und das sogar in nicht-epithelialen Zellen, wie Fibroblasten [Itoh et al., 1993]. Die Molekülmasse von ZO-1 liegt zwischen 210 kDa und 225 kDa, was sich durch die Existenz zweier Isoformen, welche durch alternatives RNA-Spleißen entstehen, erklären lässt.

Wie bereits erwähnt, besitzt ZO-1 drei PDZ-Domänen, welche 90 Aminosäuren lange Protein-Protein-Bindungsdomänen mit einem repetitiven GLGF Motiv darstellen. Außerdem hat es eine SH3-Domäne, die in anderen Proteinen Prolin-reiche Sequenzen binden kann [Ren et al., 1993], und eine Guanylat-Kinase-Domäne (GuK), die keine enzymatische Aktivität besitzt [Willot et al., 1993] (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Schematische Darstellung der konservierten Domänen von ZO-1. PDZ-Domänen sind in blau, die SH₃-Domäne in grün, die Guanylat-Kinase-Domäne in orange und die ZU5-Domäne in grau dargestellt.

Während andere Mitglieder der MAGUK-Familie eine Rolle bei der Bündelung von Rezeptoren und Kanälen in der Plasmamembran spielen, ist die Funktion von ZO-1

dagegen unklar. Ergebnisse von *In Vitro* Studien lassen zumindest die Funktionen einiger ZO-1-Domänen erahnen. So wandert die exogen exprimierte N-terminale Hälfte von ZO-1 in Epithel- und Endothelzellen zu den Zellmembranen, während die C-terminale Hälfte an Aktin-Filamente bindet [Itoh et al., 1997 und Fanning et al., 1998]. Durch genauere Untersuchungen der Domänen konnten mögliche Bindungspartner identifiziert werden. Dabei wurde die erste PDZ-Domäne (PDZ1) für die Claudin-Bindung verantwortlich gemacht [Itoh et al., 1999]. ZONAB, ein Nucleinsäure-bindendes Protein, welches ebenfalls in Tight Junction-Plaques lokalisiert ist, interagiert mit der SH3-Domäne von ZO-1 [Balda et al., 2000]. Die GuK-Domäne hat sich als Bindestelle für das Occludin herausgestellt [Matter et al., 2003]. PDZ2 bindet an sich selbst, was zur Bildung von Homodimeren führt [Utepbergenov et al., 2006]. Diese Dimerisierung konnte von Fanning und Kollegen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestätigt werden, wobei sich herausstellte, dass diese Bindung durch ein intermolekulares β -Faltblatt stabilisiert wird. In Abbildung 4 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt.

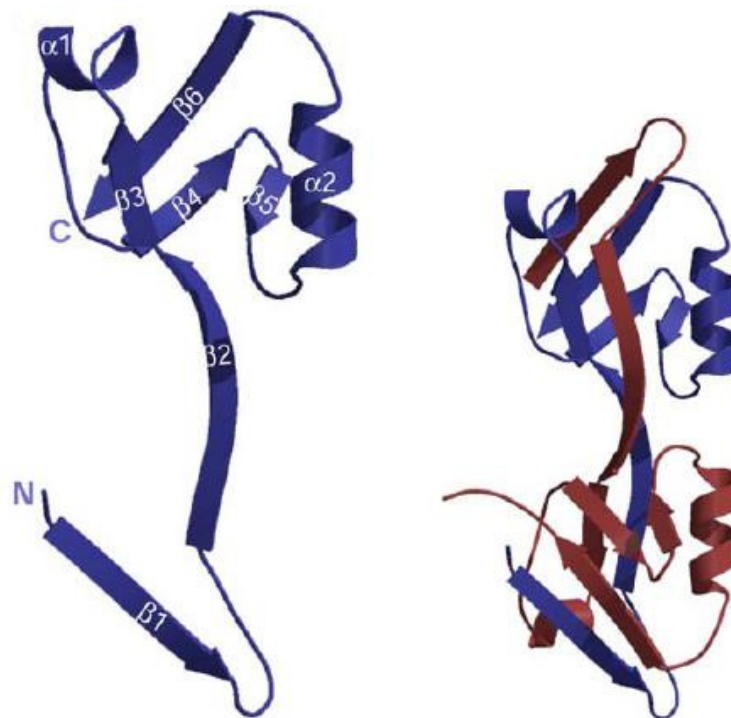


Abb. 4: Darstellung der zweiten PDZ-Domäne von ZO-1. Links ist das Monomer mit beschrifteten Sekundärstrukturelementen gezeigt. Die N- und C-Termini sind markiert. Rechts ist das Dimer dargestellt, wobei ein Monomer blau, das andere rot gefärbt ist. [Fanning et al., 2007]

Nach Yamamoto und Imamura interagiert ZO-1 auch mit dem Ras-Effektor AF6 [Yamamoto et al., 1997 und Imamura et al., 1999]. Da es sich hierbei um einen zentralen Bestandteil dieser Arbeit handelt, wird an späterer Stelle näher auf diese Interaktion eingegangen.

Die Funktion von ZO-1 scheint sich nicht nur auf Tight Junctions und Adherens Junctions zu beschränken. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass ZO-1 zwischen der Cytoplasmamembran und dem Zellkern hin und her wandert und somit möglicherweise eine direkte Rolle bei der zellulären Signaltransduktion spielt [Gottardi et al., 1996 und Islas et al., 2002]. Ein Teil dieser Signalfunktion ist dabei wahrscheinlich auf die Interaktion mit dem Y-Box-Faktor ZONAB zurückzuführen, welche durch die Regulation der CDK4-Lokalisation die Zelldichte von MDCK-Zellen kontrolliert [Balda et al., 2000].

Die Rolle von ZO-1 bei der Onkogenese ist dagegen noch nicht näher untersucht, obwohl seine strukturelle Ähnlichkeit zum Tumor-Suppressor disk-large von *Drosophila* eine Krebs-präventive Eigenschaft vermuten lässt [Willott et al., 1993]. Dafür spricht auch die Entdeckung, dass in 68% von Brustkrebszellen die Expression von ZO-1 vermindert ist [Chlenski et al., 1999], was eine erhöhte Beweglichkeit der Zellen und damit die Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung zur Folge hat. Interessanterweise ist dagegen die ZO-1-Expression in Hautkrebszellen erhöht. In diesem Fall ändert sich dadurch die Zellmorphologie, was ebenfalls zu einer verbesserten Invasivität führt [Keiran et al., 2005]. Diese Beispiele zeigen, dass ZO-1 sowohl krebshemmend als auch -förend wirken kann, je nachdem, in welchem zellulären Kontext es exprimiert wird.

Am Beispiel der Brustkrebs-Onkogenese wird außerdem die Rolle des ZO-1 als Signalprotein bestätigt. So wurde kürzlich gezeigt, dass cytoplasmatisch lokalisiertes ZO-1 die Expression von Matrix-Metalloproteasen reguliert [Polette et al., 2005], wodurch eine Invasion und Migration der Tumorzellen ermöglicht wird.

1.1.3 Der Ras-Effektor AF6

AF6, auch Afadin genannt, ist ein F-Aktin-bindendes Protein, dessen Hauptaufgabe vermutlich darin besteht, Nectin mit dem Aktin-Cytoskelett zu verbinden [Miyahara et al., 2000]. Obwohl Claudine und Cadherine keine direkten Bindungspartner von AF6 darstellen, ist man der Meinung, dass durch eine direkte oder indirekte Interaktion

von AF6 und ZO-1 sowohl Tight Junctions als auch Adherens Junctions zu den Nectin-vermittelten Zell-Zell-Bindestellen rekrutiert werden. Um diesen Mechanismus zu verstehen, ist die Kenntnis der molekularen Struktur von AF6 wichtig.

AF6 kommt in zwei Spleiß-Varianten vor: l-Afadin und s-Afadin. In Adherens Junctions verbindet l-Afadin das Aktin-Cytoskelett mit der Zytoplasmamembran, da s-Afadin keine Aktin-Bindedomäne besitzt. Während l-Afadin in allen Geweben exprimiert wird, kommt die kurze Isoform s-Afadin nur im Gehirn vor [Mandai et al., 1997]. AF6 ist ein Multidomänen-Protein mit einer PDZ-Domäne, zwei Ras-Bindedomänen, einer Forkhead-assoziierten (FHA) Domäne, einer Dilute- (Dil-) Domäne und drei Prolin-reichen Domänen (siehe Abb. 5).



Abb. 5: Darstellung der konservierten Domänen von AF6. Ras-Bindedomänen sowie die PDZ-Domäne sind in blau und die Dilute-Domäne in grau dargestellt.

Die PDZ-Domänen von AF6 interagieren mit Nektin und der Eph-Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen über deren C-Terminus. Die Interaktion mit Nektin ist wichtig für dessen Rekrutierung an den Adherens Junctions, während die Interaktion mit dem Eph-Rezeptor die Signal-Weiterleitung an der postsynaptischen Membran in excitatorischen Synapsen im Hippocampus aktiviert [Buchert et al., 1999]. Die Rolle von AF6 bei der Signaltransduktion wird weiterhin durch die Tatsache untermauert, dass es durch seine Ras-Bindedomäne als Effektor an aktiviertes Ras und sogar noch stärker an Rap1a bindet. Eine NMR-basierte Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Ras-Bindedomäne ergab, dass sie ein sogenanntes „Ubiquitin α/β roll“ Faltungsmotiv besitzt. Wie sich zudem heraus gestellt hat, wird der Ras-AF6 Proteinkomplex durch ein intermolekulares antiparalleles β -Faltblattsystem stabilisiert [Dissertation Ralph Elsner, 2006].

Weil auch die kurze Isoform s-Afadin an Ras bindet, geht man davon aus, dass die Rolle bei der Signaltransduktion unabhängig von der Aktin-Bindung ist. So wurde gezeigt, dass AF6 die Integrin-vermittelte Zell-Adhäsion an Fibronectin kontrolliert, indem es die Aktivität von Rap1a reguliert [Zhang et al., 2005]. Auch Canoe, das Drosophila-Homologe von AF6, wurde als Rap1-Effektor *in vivo* identifiziert [Gaengel et al., 2003]. Die Byr-Kinase phosphoreliert AF6, was wiederum die Bindungsaffinität von AF6 an Ras erhöht. Da AF6 die Byr-Kinase mit seiner PDZ-Domäne bindet und Ras über seine Ras-Bindedomäne, scheint AF6 als Gerüst zu fungieren, welches

Ras und Byr an zelluläre Verbindungen koppelt. Dieser Komplex wird für die Down-Regulation von Ras-vermittelten Signalen an Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich gemacht, um diese Zellen an einer Proliferation zu hindern [Radziwill et al., 2003].

Bei der Maus-Entwicklung ist AF6 für die Ausbildung interzellulärer Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Mäuse, die kein AF6 produzieren, zeigen Entwicklungsstörungen während und nach der Gastrulation, wie eine Disorganisation des Ectoderms und ungleichmäßige Verteilung des Mesoderms [Zhadanov et al., 1999]. Man kann also davon ausgehen, dass AF6 bei der Morphogenese von Geweben eine Schlüsselrolle spielt, indem es für die fehlerfreie Organisation von Tight Junctions und Adherens Junctions verantwortlich ist.

1.1.4 Die Interaktion von ZO-1 und AF6

Wenn Zellen wandern oder in die mitotische Phase übergehen, müssen sich ihre Zellverbindungen einer dynamischen Remodellierung unterziehen. Obwohl man bereits vermutet, dass die Organisation dieser Verbindungen durch bestimmte intrazelluläre Signalwege reguliert sein muss, ist über die genauen Mechanismen dieser Regulation noch sehr wenig bekannt. Es existieren allerdings Hinweise, dass kleine GTPasen wie Ras und Rho an der Regulation der Zelladhesion mitwirken [Hall et al., 1994]. Diese Moleküle, die der Ras-Superfamilie zuzuordnen sind, spielen eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Weiterleitung externer Signale. Sie können in zwei Zuständen vorliegen, indem sie entweder an GTP oder GDP gebunden sind, wobei nur der GTP-gebundene Zustand eine Effektorbindung und somit eine Signalweiterleitung erlaubt. Ein Bindeglied zwischen dieser Ras-Signaltransduktion und den Zelladhesions-Komplexen scheint auch schon gefunden zu sein. Es handelt sich dabei um das oben beschriebene AF6, das einen Effektor von aktiviertem Ras darstellt und in unmittelbarer Umgebung von Zell-Zell-Kontaktstellen gefunden wurde, wo es zusammen mit ZO-1 lokalisiert ist. So zeigten Shen und Kollegen mittels Immunofluoreszenz, dass AF6 an Tight Junctions konzentriert ist und diese Verteilung mit der von ZO-1 praktisch identisch ist. Außerdem konnten sie durch *in vitro* Experimente sowohl zeigen, dass AF6 an ZO-1 bindet, als auch die ZO-1-Bindedomäne des AF6 identifizieren [Shen et al., 2001]. Nach ihren Untersuchungen handelt es sich dabei um den Bereich von Aminosäure 36 bis 206, welcher mit der Ras-Bindedomäne 1 bis 141 in weiten Teilen übereinstimmt. Ob es sich dabei um die

identische Domäne handelt oder ob die Bindestellen nur sehr nahe beieinander liegen, blieb dabei offen. Zudem blieb die Frage, welche ZO-1-Domäne für die Bindung an AF6 verantwortlich ist, ebenfalls unbeantwortet. Als mögliche Bindedomäne wurde die SH3-Domäne vorgeschlagen. Bekannt ist jedoch lediglich, dass sie sich in der N-terminalen Hälfte von ZO-1 befinden muss.

1.2 Das Hefe-Zellwandprotein Aga2

1956 beobachtete Wickerham beim Vermischen verschiedener Hefe-Stämme Aggregationen, die sich bei den unvermischten Stämmen nicht einstellten. Schon bald stellte sich heraus, dass es sich dabei um haploide Stämme entgegengesetzten Paarungstyps handelte. Man vermutete, dass dieser Aggregationsprozess von spezifischen Oberflächenproteinen ermöglicht wurde, die von den jeweiligen Paarungstypen exprimiert werden [Wickerham et al., 1956].

Hefen sind einzellige Eukaryonten, die sowohl haploid als auch diploid vorkommen, wobei diploide Zellen durch Paarung zweier haploiden Zellen entstehen. Diploide Zellen sind von den beiden Elterntypen verschieden, da sie sich nicht mehr paaren, dafür aber Sporen ausbilden können, aus denen durch Meiose wiederum haploide Zellen hervorgehen. So können Hefen optimal auf verschiedene Umweltbedingungen, wie zum Beispiel Änderungen im Nahrungsangebot, reagieren.

Eine Voraussetzung für die Paarung zweier haploider Zellen ist die Existenz verschiedener Paarungstypen. Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* unterscheidet man die Paarungstypen Mat-a und Mat- α . Um die Paarung zu ermöglichen, produziert jeder dieser Paarungstypen ein Oberflächenprotein, welches mit dem komplementären Protein des entgegengesetzten Typs interagiert und so den Kontakt der Zellen herstellt. Dabei kommt es vor, dass eine Zelle mit mehreren anderen in Kontakt tritt, was eine Aggregation zur Folge hat, die als Agglutination bezeichnet wird. Diese ist Kalzium-unabhängig und somit von der Kalzium-abhängigen Flokkation mancher Hefestämme zu unterscheiden [Lipke et al., 1984]. Die entsprechenden Oberflächenproteine nennt man daher Agglutinine, wobei α -Zellen das α -Agglutinin produzieren, während das komplementäre Protein der a-Zellen als a-Agglutinin bezeichnet wird.

Beim α -Agglutinin (Aga α) handelt es sich um ein hitzestabiles Glycoprotein mit einer molekularen Masse, die, abhängig vom Kohlenhydrat-Anteil, zwischen 140 kDa und

400 kDa liegt [Terrance et al., 1987]. Abgesehen davon besteht das Protein aus einer einzigen Polypeptidkette, welche keine Disulfidbrücken aufweist.

Im Gegensatz dazu setzt sich das komplementäre Protein α -Agglutinin (Aga) aus zwei Untereinheiten zusammen, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die molekulare Masse von Aga kann zwischen 23 kDa und 200 kDa betragen, was auch hier auf einen variablen Kohlenhydratanteil zurückzuführen ist [Wagner et al., 1983]. Die Untereinheit Aga1 ist für die Verankerung des Proteins in der Zellwand verantwortlich. Sie besteht aus 725 Aminosäuren und besitzt einen hydrophoben N- und C-Terminus für den sekretorischen Pfad und die Integration in die Zellmembran. Außerdem besitzt sie zwei homologe Regionen, die durch etwa 250 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Diese Regionen beinhalten jeweils fünf der insgesamt elf Cysteine, die im gesamten Protein vorkommen. Da ein Cystein im hydrophoben Teil lokalisiert ist und somit an der Zellwand-Verankerung beteiligt ist, muss die Disulfid-Verbindung zur zweiten Untereinheit von einer dieser beiden Regionen ausgehen [Roy et al., 1991]. Diese zweite Untereinheit Aga2 stellt bei der Paarung den Kontakt zum komplementären Protein α -Agglutinin her. Nach Abspaltung einer 18 Aminosäuren langen Signalsequenz besteht sie aus 69 Aminosäuren, wobei mindestens zehn der 21 Serin- und Threoninreste O-glycosyliert sind [Cappellaro et al., 1991]. Die Cysteine auf den Positionen 7 und 50 stellen die Verbindung zum Aga1 und somit zur Zelloberfläche her. Um einen Verlust der Agglutinationsfähigkeit herbeizuführen, müssen beide Cysteinreste mutiert sein. Synthetische oder proteolytische Peptide, die den C-Terminus der Domäne enthalten, zeigen eine starke Bindungsaffinität zum α -Agglutinin, woraus man schließt, dass diese Region für die Rezeptorbindung verantwortlich ist [Cappellaro et al., 1994]. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung von Aga.

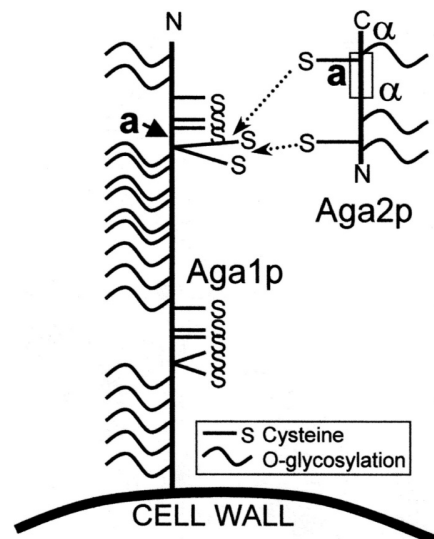


Abb. 6: Schematische Darstellung von Aga. Die N- und C-Termini der Untereinheiten sind markiert. Einige Glykosylierungsstellen sind gezeigt. Regionen, die an der Interaktion der Untereinheiten beteiligt sind, sind mit *a* beschriftet, jene, die für die Bindung an α -Agglutinin verantwortlich sind, mit α . Die beiden Disulfidbrücken sind mit Pfeilen markiert. [Shen et al., 2001]

Untersuchungen an Komplexen von Agglutininen entgegen gesetzten Paarungstyps zeigten, dass diese Proteine in direkten Kontakt miteinander treten, und zwar in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1. Das heißt, jedes α -Agglutinin interagiert mit einem einzigen Molekül *a*-Agglutinin [Crandall et al., 1974]. Eine Analyse der Kontaktflächen zwischen den Zellen ergab, dass diese Protein-Interaktionen an mehreren Punkten der Zelloberflächen stattfinden. Die Assoziationskonstanten der Proteine reichen dabei von 10^8 bis 10^{10} M. Die Anzahl der Bindestellen pro Zelle variiert in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen und der Pheromonkonzentration. So steigt die Anzahl an *a*-Agglutinin-Molekülen einer Mat-*a*-Zelle von etwa 10^4 im nicht induzierten Zustand auf 5×10^5 nach Pheromon-Induktion [Terrance et al., 1987 und Watzele et al., 1988]. Die Bindungsstärke zweier Zellen hängt somit eher von der Anzahl der interagierenden Agglutinin-Moleküle ab, als von deren Assoziationskonstanten.

Verantwortlich für die Interaktion dieser beiden Moleküle sind im Falle des α -Agglutinins der Histidyl-Rest His₂₇₃ und mehrere Stellen in der Region der Aminosäuren 259 bis 331 [Cappellaro et al., 1991 und Wojciechowicz et al., 1993]. Um die Aminosäuren des *a*-Agglutinins zu identifizieren, die vom α -Agglutinin erkannt werden, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zunächst wurde durch gezielte Mutagenese untersucht, ob sich die Bindung auf Ionenpaar-Formationen zurückführen lassen. Nachdem dies ausgeschlossen werden konnte, wurden *a*-Agglutinin-Fragmente

verschiedener Größe auf Agglutinabilität getestet. Diese Untersuchung ergab, dass ein C-terminales Fragment mit der Sequenz GSPINTQYVF für eine Interaktion mit α -Agglutinin ausreicht [Cappellaro et al., 1994]. Auf dieses Ergebnis aufbauend konnten Shen und Kollegen die Bindungs-Region noch weiter eingrenzen. Ihren Ergebnissen zufolge spielen die beiden letzten Aminosäuren Val86 und Phe87 eine ausschlaggebende Rolle, aber auch Mutationen in einer zentraleren Region des Proteins (Aminosäuren 48 bis 50) verminderten die Bindungsaffinität signifikant, was darauf hindeutet, dass auch diese Region an der Bindung an α -Agglutinin beteiligt ist [Lipke et al., 1997].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Erforschung interzellulärer Verbindungen ist aktuell Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen. Dies liegt nicht zuletzt an der Erkenntnis, dass zahlreiche Krankheiten auf Defekte solcher Verbindungen zurückzuführen sind, wie Multiple Sklerose oder Krebs.

Während Zusammensetzung und Aufbau diverser Zell-Zell-Verbindungen mittlerweile weitgehend bekannt sind, liegen die zugrunde liegenden regulatorischen Vorgänge derselben im Dunkeln. Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die Ras-Signalkaskade einen Einfluss auf die Dynamik interzellulärer Verbindungen, vor allem Tight Junctions, haben könnte. Mit dem Ras-Effektor AF6 konnte bereits ein mögliches Bindeglied zwischen beiden Systemen identifiziert werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der Interaktion des Ras-Effektors AF6 mit dem Tight Junction-Protein ZO-1. Dazu sollte in erster Linie die AF6-Bindedomäne von ZO-1 identifiziert werden. Anschließend sollten mit Hilfe biochemischer Methoden sowie der NMR-Spektroskopie Interaktionsstudien durchgeführt werden, mit dem Ziel, genauere Aussagen über die an der Bindung beteiligten Komponenten treffen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Expressions- und Präparationssystems für das Hefe-Zellwandprotein Aga2, um es zum Zwecke einer Strukturaufklärung der NMR-Spektroskopie zugänglich zu machen. Eine hohe Ausbeute bei hohem Reinheitsgrad zu erreichen war dabei ebenso wichtig wie ein nativer Faltungszustand des Proteins.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

ÄKTA FPLC	Amersham
Mikroliterpipetten	Gilson
Mastercycler Personal	Eppendorf
Peristaltikpumpe Minipuls 3	Abimed
pH-Meter q32	Beckman
Schüttelinkubator Multitron AJ	HT Infors
SDS-PAGE Gelapparatur	cti
Semi-Dry-Blotting-Apparatur	Biometra
Steril-Werkbank MSC12	Jouan
Thermomixer compact	Eppendorf
UV/Vis Photometer DU 640	Beckman
Ultrafiltrationsröhrchen Vivaspin	Vivascience
Zentrifuge J-6B	Avanti
Zentrifugen J20 und J25	Beckman
Zentrifuge Biofuge	Heraeus

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Bezugsquellen waren die Firmen Amersham (Freiburg), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu Biotechnik (Gaiberg), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Penzberg), Roth (Karlsruhe), und Sigma Aldrich Chemicals (Steinheim). Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* erworben.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Zur besseren Übersicht sind alle Puffer und Lösungen dem entsprechenden Verwendungszweck zugeordnet.

(a) Herstellung kompetenter Zellen

TSS-Puffer: 85% LB₀
10% PEG 8000
5% DMSO
50 mM MgCl₂

(b) Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:

4,84 g Tris
1,14 ml Eisessig
1 ml 0,5 M EDTA pH 8
H ₂ O ad 1 l

(c) Native Proteinreinigung

GSH-Bindepuffer: 10 mM Na-Phosphat pH 7,4
 100 mM NaCl
 1 mM DTT

GSH-Elutionspuffer: 50 mM Tris-Cl pH 7,4
10 mM reduziertes Glutathion
1 mM DTT

(d) Denaturierende Proteinreinigung

Puffer A:

- 100 mM NaH₂PO₄
- 10 mM Tris, pH 8,0
- 6 M Guanidinium Hydrochlorid
- 10 mM β-Mercaptoethanol
- 5 mM Imidazol

Puffer C: wie Puffer A, nur pH 6,3

Puffer E: wie Puffer A, nur pH 4,5

(e) *In Vitro* Proteinexpression

S30-Puffer: 14 mM Mg(OAc)₂
60 mM KOAc
10 mM Tris-OAc pH 8,2

	1 mM DTT
	1 mM β -Mercaptoethanol
	DEPC-H ₂ O
Präinkubationspuffer:	293,3 mM Tris-OAc pH 8,2
	9,2 mM Mg(OAc) ₂
	13,2 mM ATP
	260 mM Creatinphosphat
	4,4 mM jeder Aminosäure
	1 mg/ml Creatinkinase
	DEPC-H ₂ O
(f) SDS-PAGE	
Schägger-Gelmix:	0,35 ml Acrylamid-Mix
	125 mM Tris
	0,1% SDS
	H ₂ O ad 4 ml
Anodenpuffer:	0,2 M Tris-Cl
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris-Cl pH 8,25
Färbelösung:	0,5 g Coomassie Brilliant Blue G
	2,0 g Coomassie Brilliant Blue R
	450 ml Ethanol
	100 ml Eisessig
	450 ml H ₂ O
Entfärber:	20% Ethanol
	10% Eisessig
	H ₂ O
(g) Western Blot	
Western-Blot-Puffer:	20% Methanol
	48 mM Tris
	38 mM Glycin
TBS(-Tween)-Puffer:	10 mM Tris-Cl pH 8

150 mM NaCl
(0,1% Tween 20)

PVDF-Färbelösung: 0,2% Coomassie R250
50% Methanol
10% Eisessig

PVDF-Entfärber: 50% Methanol
10% Eisessig

2.1.4 Nährmedien

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Yeast
10 g NaCl
H₂O ad 1 l, autoklavieren

Minimalmedium nach Neidhardt:

Salze:	K ₂ SO ₄	0,482 g	H ₂ O ad 1 l
	NaCl	29,20 g	
	KH ₂ PO ₄	1,796 g	
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,074 g	
Spuren:	Titriplex 1	0,96 g	H ₂ O ad 100 ml
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,28 g	
	CaCl ₂ (0,5 M)	100 µl	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ (43 mM)	100 µl	
	H ₃ BO ₃ (0,4 M)	100 µl	
	CoCl ₂ (30 mM)	100 µl	
	CuSO ₄ (10 mM)	100 µl	
	MnCl ₂ (80 mM)	100 µl	
	ZnSO ₄ (10 mM)	100 µl	

Ansatz für 1 l gebrauchsfertiges MM:

Salze	100 ml
Spuren	1 ml

Glukose	40 g (= 4%)	
Thiamin (0,34 g/ml)	1 ml	
MOPS/KOH pH 7,4 (1M)	80 ml	
NH ₄ Cl	1 g	H ₂ O ad 1l
sterilfiltrieren		

New Minimal Medium (NMM):

Minimalmedium:	Na ₂ HPO ₄	7,5 g	
	KH ₂ PO ₄	3,0 g	
	NaCl	0,5 g	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g	H ₂ O (Millipore) ad 900 ml
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,014 g	autoklavieren
SL-6 Stammlösung:	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg	
	MnCl ₂	30 mg	
	H ₃ BO ₃	300 mg	
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg	
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg	H ₂ O (Millipore) ad 1 L,
	NiCl x 6 H ₂ O	20 mg	sterilfiltrieren
	Na ₂ MoO ₄	30 mg	(bei 4 °C lagerfähig)
10 x SL-4:	EDTA	500 mg	
	Stammlösung FeSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg	
	H ₂ O (Millipore)	ad 90 ml	(immer frisch ansetzen)
SL-Mix:	SL-6	1,0ml	
	10 x SL-4	0,9ml	
	H ₂ O (Millipore) ad	10ml,	sterilfiltrieren

Ansatz für 1L gebrauchsfertiges MM:

Minimalmedium	900 ml
SL-Mix	10 ml
Glucose 200 mg/ml (sterilfiltriert)	20 ml (= 4 g/L)
NH ₄ Cl 200 mg/ml (sterilfiltriert)	5 ml (= 1 g/L) H ₂ O ad 1 L

2.1.5 Enzyme und andere Proteine

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Anti-RNase	Ambion, Frankfurt am Main
Creatinkinase	Roche, Mannheim
DpnI	Stratagene, LaJolla, USA
His-Probe (α -His ₆ -Antikörper)	Santa Cruz, USA
Lysozym	Sigma, Steinheim
Pfu Turbo	Stratagene, LaJolla, USA
BamHI	New England Biolabs, USA
NdeI	New England Biolabs, USA
XhoI	New England Biolabs, USA
M-MLV Reverse Transcriptase	USB, Cleveland, Ohio
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
α -rabbit Peroxidase Konjugat	Amersham, Freiburg

2.1.6 Bakterienstämme

E. coli TG1	supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F ⁻ [traD 36 proAB ⁺ LacI ^q lacZ Δ M15] (NEB, Maryland, USA)
E. coli BL21	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B m _B), gal, dcm (Novagene, Madison, Wisconsin)
E. coli BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B m _B), gal, dcm, DE3 (Novagene, Madison, Wisconsin)
E. coli Rosetta pLysS	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B m _B), gal, dcm, lacYI, DE3, pLysSRARE ² (CM ^R) (Novagene, Madison, Wisconsin)
E. coli CK600K	McrA ⁻ , supE44, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21 (Stratagene, Heidelberg)
E. coli ER2566	F ⁻ , λ ⁻ , fhuA2, ompT, lacZ::T7 gene1, gal, sulA11 (NEB, Maryland, USA)

2.1.7 Plasmide

pET14b	Merck, Darmstadt
pET21	Merck, Darmstadt
pET DUET	Merck, Darmstadt
pGEX 4T1	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

2.1.8 Standards

DNA-Standards (NEB, USA):

100 bp Leiter: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp

1 kb Leiter: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb

Protein-Standard:

Dalton 7L: 14, 20, 24, 29, 36, 45, 66 kD (Sigma, Steinheim)

2.1.9 Fertigkits

Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiafilter Plasmid Midi oder Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Illinois, USA
ECL+ Detection Kit	Amersham, Freiburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.10 Chromatographie-Säulen

Superdex 75 HR 10/30	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Superdex 75 HiLoad 16/60	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
GSH-Sepharose	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um chemisch kompetente Zellen herzustellen, wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 10 ml TSS-Puffer resuspendiert. In Aliquots zu je 200 µl konnten die Zellen, nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff, bei -80 °C gelagert werden.

Entscheidend für den Erfolg war, dass die gesamte Prozedur auf Eis durchgeführt wurde.

2.2.1.2 Präparation von DNA / RNA

Sowohl zu Klonierungszwecken als auch für die InVitro-Proteinexpression wurde gereinigte Plasmid-DNA benötigt.

Zur Isolierung dieser DNA aus E.coli wurden die Fertigkits von QIAGEN verwendet. Je nach Bedarf wurden Mini-, Midi- und Maxiprep-Kits verwendet. Das Ausgangsmaterial stellten immer pelletierte Übernachtskulturen dar. Die Präparationen wurden streng nach den mitgelieferten Anleitungen durchgeführt.

Auch die für die Reverse Transkription benötigte mRNA wurde mit Hilfe eines QIAGEN Fertigkits (RNeasy) isoliert. Jedoch wurde hier als Ausgangsmaterial Rattenleber verwendet. Diese musste dem Tier frisch entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Für die RNA-Isolierung wurden lediglich 30 mg Leber benötigt.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung gewünschter DNA-Fragmente kam die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz. Dabei setzte sich ein klassischer Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

Primer Sense:	100 pmol
Primer Antisense:	100 pmol
Template-DNA:	60 ng
dNTPs 2 mM:	10 µl
10x Puffer:	10 µl
Taq-Polymerase:	1 µl
H ₂ O:	ad 100 µl

Die benötigten Primer wurden so konstruiert, dass sie eine Schmelztemperatur von 60°C aufwiesen. Außerdem wurden an ihren 5'-Enden für den Einbau in Expressionsvektoren geeignete Restriktionsschnittstellen angefügt.

Die eigentliche Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

1	1min30sec	95 °C
2	30sec	95 °C
3	1min	55 °C
4	1 min	72 °C
5	goto 2	35 Zyklen
6	hold	4 °C

Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde anschließend anhand eines analytischen Agarose-Gels überprüft.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe und wurde sowohl zu präparativen als auch zu analytischen Zwecken eingesetzt. Dazu wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 1% (w/v) hergestellt, als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (48,4 g Tris, 11,4 ml Eisessig, 10 ml 500 mM EDTA, pH 8,0, ad 1 l H₂O) verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde dem Gel Ethidiumbromid zugegeben.

2.2.1.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Um DNA für Klonierungsarbeiten sequenzspezifisch zu schneiden, wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten bei einem Gesamtvolumen von 20 µl neben dem entsprechenden Puffer bis zu 2 µg DNA, sowie die gewünschten Restriktionsenzyme. Die Inkubation bei 37 °C dauerte je nach Aktivität des Enzyms bis zu 20 Stunden. Doppelverdau wurden meist sequenziell durchgeführt, da hierbei ein besseres Ergebnis zu erwarten war.

Um bei der nachfolgenden Ligation falsch positive Klone durch Religation des Vektors zu eliminieren, wurde dieser im Anschluss an den Verdau dephosphoreliert. Dazu wurden dem Verdauansatz 10 µl Puffer 3 (New England Biolabs) sowie 2 µl Alkalische Phosphatase (CIP) und 68 µl H₂O zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C und dauerte eine Stunde.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach dem Verdau wurden die gereinigten DNA Fragmente durch eine Ligation zu den gewünschten Konstrukten zusammengefügt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Reaktion durch die T4-Ligase von MBI Fermentas katalysiert, welche bei einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur die besten Resultate erzielte. Entscheidend für den Erfolg der Ligation ist unter anderem das richtige molare Verhältnis von Vektor zu Insert, welches idealerweise zwischen 1/5 und 1/10 liegen sollte.

2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Im Anschluss an die Ligation erfolgte meist direkt die Transformation, bei der zu den gesamten Ligationsansätzen 200 µl kompetente Zellen gegeben wurden. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock bei einer Temperatur von 42 °C und einer Dauer von 90 Sekunden. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen zur Regeneration eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB-Agar, welcher ein geeignetes Antibiotikum enthielt, ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die erhaltenen Kolonien durch Kolonie-PCR auf Vorhandensein des

gewünschten Inserts geprüft. Positive Klone wurden außerdem durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.8 Herstellung von Glycerinkulturen

Um neue Klone dauerhaft zu konservieren, wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurde eine Übernachtskultur bei 4 °C abzentrifugiert und anschließend in 1 ml einer 15-prozentigen Glycerinlösung resuspendiert. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff konnte sie dann bei -80 °C gelagert werden.

2.2.1.9 Gerichtete Mutagenese

Für das Einführen von spezifischen Punktmutationen wurde eine sogenannte ortsspezifische Mutagenese durchgeführt. Diese stellt eine besondere Anwendung der PCR-Technik dar, bei der anstelle eines kleinen Fragments das gesamte Plasmid synthetisiert wird, wobei die Primer komplementär zueinander sind und in ihrer Mitte die gewünschte Punktmutation tragen.

Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt somit 20 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10xPuffer, 5 µl dNTPs, je 1 µl Primer und 1 µl Pfu-Polymerase. Das Cyclor-Programm unterschied sich von einem herkömmlichen PCR-Programm lediglich durch eine längere Elongationszeit, welche 2,5 min/kb betrug.

Als Template wurde üblicherweise Plasmid-DNA eingesetzt, welche dam-methyliert war. Diese konnte nach erfolgter Mutagenese durch Zugabe von 1 µl DpnI abgebaut werden, um falsch positive Klone zu eliminieren.

Die Ansätze wurden anschließend direkt in TG1 transformiert. Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung auf den Einbau der Punktmutation überprüft.

2.2.1.10 Reverse Transkription

Die für die PCR als Template benötigte cDNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkription hergestellt. Dafür wurde ein antisense Primer benötigt, welcher an das

3'-Ende des gesuchten Gens bindet. Die Reaktion wurde von der M-MLV Reverse Transcriptase (USB) katalysiert.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 X Reaktion Buffer	10,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2,5 µl
Primer	1 µg
mRNA	2 bis 5 µg
RNase-Inhibitor	1,0 µl
M-MLV-Reverse Transcriptase	2,5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl

Die Inkubation bei 37°C dauerte 30 Minuten. Anschließend wurde die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 75°C gestoppt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 *In Vivo* Expression von Proteinen

Die In-Vivo-Expression stellt die klassische Methode zur Proteingewinnung dar. Hierzu wird der Vektor, der das zu exprimierende Gen trägt, in geeignete *E. coli*-Zellen eingebracht, welche dann durch Induktion zur Überexpression angeregt werden. Anschließend werden die Zellen aufgeschlossen und das Zielprotein über geeignete Präparationsmethoden gereinigt und konzentriert.

2.2.2.1.1 Anzucht einer Expressionskultur

Die Anzucht erfolgte in jedem Fall in LB-Vollmedium, welchem ein geeignetes Antibiotikum zugesetzt wurde.

Um ein schnelles Wachstum der Zellen gewährleisten zu können, wurde zunächst eine Vorkultur angefertigt, welche über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde die Hauptkultur mit einer Verdünnung von 1/100 angeimpft und bis zur gewünschten OD₆₀₀ inkubiert. Durch Zugabe von IPTG wurden die Zellen induziert und bei angepasster Temperatur weiter inkubiert, bevor sie bei

3800 rpm und 4°C geerntet wurden. Je nach Zeitplan wurde das Zellpellet an dieser Stelle bei -20°C eingefroren oder sofort dem Zellaufschluß zugeführt.

Um die optimalen Anzucht- und Expressionsbedingungen zu ermitteln, wurden für jedes Protein Expressionstests durchgeführt, bei welchen Temperatur, IPTG-Konzentration und Expressionsdauer sowie geeignete E. coli-Stämme variiert wurden.

2.2.2.1.2 Zellaufschluss

Die Aufreinigung von Proteinen, die nicht in das umgebende Medium sezerniert werden, macht einen Aufschluß der Zellen erforderlich.

Je nach Anwendung kamen in dieser Arbeit drei verschiedene Methoden zum Einsatz:

(a) Hitzeaufschluß

Für eine quantitative Analyse der Expression ist meist ein denaturierender Hitzeaufschluß ausreichend. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei ein Zellpellet aus 1 ml einer Kultur mit $OD_{600} = 1$ mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und im Heizblock bei 95°C 10 Minuten erhitzt. Anschließend konnte es bereits auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

(b) Nativer Aufschluss mittels Ultraschall

Ein nativer Aufschluss ist immer dann notwendig, wenn das Zielprotein seinen nativen Zustand beibehalten soll, sei es zu analytischen oder präparativen Zwecken. Hierzu wurde das Zellpellet in Aufschlusspuffer (20 ml Puffer / l Zellkultur) resuspendiert und der Ultraschallbehandlung zugeführt. Die Beschallung erfolgte im Falcon-Röhrchen und dauerte 3 mal 10 Sekunden. Anschließend wurde das Zelllysate bei 4°C und 12000 g abzentrifugiert. Für eine Analyse des Löslichkeitszustandes des Zielproteins konnte an dieser Stelle von Pellet und Überstand ein Aliquot für die Gelelektrophorese entnommen werden.

Um etwaige DNA-Verunreinigungen zu minimieren, wurde der Rohextrakt mit einer Spatelspitze DNase I versehen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei war zu beachten, dass der Aufschlusspuffer $MgCl_2$ in einer Konzentration von mindestens 2 µM enthalten sollte.

Anschließend konnte zur Reinigung des Zielproteins übergegangen werden.

(c) Denaturierender Aufschluss

Die Präparation eines Proteins, welches unlöslich in so genannten Einschlusskörperchen („*Inclusion Bodies*“) vorliegt, macht es erforderlich, den Aufschluss unter denaturierenden Bedingungen durchzuführen. Dazu wurde Guanidinium-Hydrochlorid (GuaHCl) als chaotropes Agens verwendet.

Um eine Vorreinigung des Zielproteins zu erreichen, wurde zunächst ein Ultraschallaufschluss durchgeführt. Da sich hier jedoch das gewünschte Protein im Pellet befand, wurde der Überstand verworfen, und somit ein Großteil der zellulären Proteine. Das Pellet, in dem sich neben den Einschlusskörperchen noch andere unlösliche Zellbestandteile befanden, wurde in Puffer A (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl pH8, 6 M GuaHCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 5 mM Imidazol) resuspendiert und bei Raumtemperatur zwei bis drei Stunden inkubiert, bis die Suspension klar wurde. Anschließend folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 12000 g, um die Lösung von noch immer ungelöstem Material zu befreien. Das Zielprotein, welches sich nun im Überstand befand, konnte anschließend durch weitere Reinigungsschritte isoliert werden.

2.2.2.2 *In Vitro* Expression von Proteinen

Bei der *In Vitro* Expression handelt es sich um ein zellfreies System zur Herstellung von Proteinen. Gerade bei Proteinen, welche bei der klassischen zellulären Synthese Probleme bereiten, hat sich dieser Ansatz bewährt.

Bei der Durchführung der *In Vitro* Expression ist zu beachten, dass dieses System sehr anfällig gegenüber RNAsen ist, da diese den Abbau der synthetisierten mRNA bewirken. RNAsen zeichnen sich sowohl durch ihr ubiquitäres Vorkommen als auch durch ihre außerordentliche Stabilität aus, was nicht nur eine besondere Sorgfalt beim Ansetzen der Synthesereaktion erforderlich macht, sondern auch eine spezielle Vorbehandlung von Lösungen und Geräten. So wurden sämtliche Glas- und Metallgeräte mindestens drei Stunden bei 200 °C gebacken. Das Wasser zur Herstellung der Lösungen wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, welches

in einer Verdünnung von 1/1000 zugesetzt wird und durch anschließendes Autoklavieren zu CO₂ und Ethanol zerfällt.

2.2.2.2.1 Lysatherstellung

Zur Herstellung des Lysats wurde eine von J. M. Pratt beschriebene Methode angewandt (Pratt et al., 1984). Dazu wurden 400 ml einer E. coli-Übernachtskultur in insgesamt 4 x 2,5 l 2TY-Medium überimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 1 wurden die Zellen geerntet und dreimal in je 500 ml S30-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in der 1,2-fachen Menge S30-Puffer homogenisiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Danach folgte die einstündige Zentrifugation bei 30000 g.

Um eventuell vorhandene mRNA von den Ribosomen abzulösen, wurde eine Präinkubation durchgeführt, indem das Lysat im 0,2- bis 0,3-fachen Volumen Präinkubationspuffer bei 37 °C geschwenkt wurde.

Zuletzt musste das Lysat aufkonzentriert werden. Dazu wurde es 45 Minuten gegen 500 ml PEG-8000 dialysiert, was zudem den Effekt hatte, dass niedermolekulare Substanzen ausverdünnt wurden. Zur weiteren Aufkonzentrierung wurden Vivaspin 3000 Konzentratoren verwendet, bevor das Lysat in Aliquots bei -80 °C aufbewahrt wurde.

2.2.2.2.2 Expression im Batchverfahren

Da im Rahmen dieser Arbeit *In Vitro* Expressionen lediglich zu analytischen Zwecken eingesetzt wurden, waren Ansätze im so genannten Batchverfahren ausreichend.

Diese wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt, welche in einem Eppendorf-Thermomixer-Compact inkubiert wurden.

Zusammensetzung:

DNA	30 µg/ml
ATP	1,23 mM
CTP, UTP, GTP	0,87 mM
T7-RNA-Polymerase	45 µg/ml
E. coli-tRNA	0,17 mg/ml
Aminosäuren	1,0 mM

Lysat	30% (v/v)
Creatinkinase (CK)	0,25 mg/ml
Creatinphosphat (CP)	80,92 mg/ml
RNAse-Inhibitor	1,27% (v/v)
HEPES-KOH (pH 7,5)	58,0 mM
PEG-8000	4,05% (v/v)
cAMP	0,64 mM
Folsäure	0,03 mg/ml
K-Glutamat	202,1 mM
Mg(OAc) ₂	3 mM
NH ₄ OAc	27,7 mM
DTT	1,77 mM

Zur Expression wurden die Ansätze eine Stunde bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze entweder direkt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert oder einer Proteinaufreinigung unterzogen.

2.2.2.3 Verfahren zur Proteinreinigung

Da für die Charakterisierung von Proteinen diese in hoher Reinheit vorliegen sollten, kamen diverse Methoden zur Proteinreinigung zum Einsatz.

2.2.2.3.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie bietet für die Proteinpräparation viele Vorteile. Durch die spezifische Wechselwirkung des kovalent an das Zielprotein gebundenen Fusionsproteins mit einem matrix-assoziierten Bindungspartner kann ein hoher Reinigungsgrad erreicht werden, während Proteinverluste meist gering bleiben. Zudem handelt es sich hierbei um eine kumulative Reinigungsform, die Proteinkonzentration bleibt – ein entsprechendes Säulenvolumen vorausgesetzt – relativ hoch.

(a) Ni-NTA-Säule

Für die Chromatographie mit einem Ni-NTA-Material muss das gewünschte Protein - durch Klonierung in einen entsprechenden Expressionsvektor - mit

einem His-Tag versehen werden, welcher sowohl N- als auch C-terminal liegen kann. In dieser Arbeit wurden für diesen Zweck pET-Vektoren der Firma Novagen verwendet.

Zur Reinigung wurde der Rohextrakt bei einer Flußrate von 1 bis 2 ml/min auf die Säule, welche zuvor mit mindestens zwei Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert wurde, aufgetragen. Um die Ausbeute zu maximieren, wurde dieser Schritt meist wiederholt. Anschließend wurde die Säule mit drei bis vier Säulenvolumen Puffer gewaschen. Dazu wurde ein spezieller Waschpuffer verwendet, der eine geringe Konzentration an Imidazol enthielt, um schwach gebundene Verunreinigungen zu entfernen. Schließlich konnte das Zielprotein mit 250 mM Imidazol eluiert werden.

(b) GSH-Säule

Proteine, die als Fusionsprotein mit einem Glutathion-S-Transferase(GST)-Tag exprimiert wurden, konnten mit Hilfe von GSH-Sepharose gereinigt werden. Die Vorgehensweise entsprach dabei der Reinigung mittels Ni-NTA, mit dem Unterschied, dass zur Elution anstelle von Imidazol nun reduziertes Glutathion in einer Konzentration von 10 mM zum Einsatz kam.

2.2.2.3.2 Gelfiltration

Um die Reinheit des Proteins nach der Affinitätschromatographie zu verbessern, wurde häufig eine Gelfiltration durchgeführt. Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der verschiedenen starken Wechselwirkung unterschiedlich großer Proteine mit den Poren des Säulenmaterials, was zu unterschiedlichen Retentionszeiten führt. Dabei kamen je nach Größe und Menge des Proteins diverse Säulen zum Einsatz.

Der Nachteil dieser Methode ist der durch die hohe Verdünnung bedingte relativ große Proteinverlust, der jedoch durch eine verbesserte Reinheit des Zielproteins kompensiert wird.

2.2.2.4 Expression von ^{15}N -markierten Proteinen

Für die Erstellung mehrdimensionaler NMR-Spektren wird ein Protein benötigt, welches mit Isotopen markiert ist, die einen Elektronenspin von $n + \frac{1}{2}$ besitzen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck Markierungen mit dem Stickstoffisotop ^{15}N durchgeführt.

Damit dieses Isotop auch quantitativ in das gewünschte Protein eingebaut wird, muss die Anzucht der Zellen in einem Minimalmedium erfolgen. Zur Auswahl standen zwei Alternativen, das Minimalmedium nach Neidhardt und das „New Minimal Medium“ (NMM).

In beiden Fällen wurde zunächst in LB-Medium eine Vorkultur angefertigt, mit deren Hilfe man am nächsten Tag - ebenso in LB-Medium - eine Hauptkultur animpfte, welche man bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubierte. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 3800 rpm abzentrifugiert und im selben Volumen Minimalmedium resuspendiert. Nach einer etwa 30minütigen Regeneration der Zellen wurden sie mit IPTG induziert und bis zur Zellernte bei optimierten Expressionsbedingungen weiter inkubiert. Das weitere Verfahren entsprach den unmarkierten Proteinen.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Gesamtprotein-Konzentration einer Proteinprobe abschätzen zu können, wurde die Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) angewandt. Diese Methode beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 mit Proteinen, was zu einer photometrisch quantifizierbaren Blauverschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm führt. Da in einem bestimmten Messbereich das Ausmaß dieser Blauverschiebung direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, kann man über eine Eichgerade aus dem Photometerwert die Konzentration bestimmen.

2.2.3.2. Proteinfällung

Um für die SDS-PAGE stark verdünnte Proben aufzukonzentrieren oder Proteinproben von störenden Agentien zu befreien, wurden Proteinfällungen durchgeführt. Die schnellste und einfachste Methode stellt dabei die Aceton-Präzipitation dar, während die TCA-Fällung bei stark verunreinigten Proben angewandt wurde.

(a) Aceton-Fällung

Zu 100 µl Proteinprobe wurden 300 µl Aceton gegeben und bei -20°C mindestens 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 16000 g und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert und das Pellet nach Trocknung bei Raumtemperatur für die SDS-PAGE vorbereitet.

(b) TCA-Fällung

Hierzu wurde die Probe mit Wasser auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und mit 125 µl 50% Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Zur Präzipitation wurde der Ansatz 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor er bei 16000 g abzentrifugiert wurde. Um das Pellet zu waschen wurde es in 1 ml Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet zur schnelleren Trocknung in 100 µl eiskaltem Ethanol gewaschen. Dann konnte die Probe für die SDS-PAGE vorbereitet werden.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode erlaubt die Auftrennung von Proteinen unterschiedlicher molekularer Masse zur Sichtbarmachung der Proteine oder zur weiteren Verwendung im Western Blot.

Um eine schärfere Auftrennung zu erreichen, wurde statt dem klassischen Lämmli-System die Variante nach Schägger und Jagow (1987) gewählt, bei der an Anode und Kathode zwei verschiedene Puffer zum Einsatz kommen.

Je nach Größe des Zielproteins wurden Gele mit einem Acrylamid-Gehalt von bis zu 20% verwendet. Die Stromstärke des Gellaufs betrug 48 mA.

2.2.3.4 Western-Blotting

Zur Identifizierung eines Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers wurden die Proteine eines SDS-Gels auf eine geeignete Membran transferiert und immobilisiert. Dazu wurde das so genannte Semi-Dry-Verfahren angewandt, bei dem das Gel, welches auf die Membran gelegt wurde, zwischen zwei mit Western-Blot-Puffer getränkten Whatman-Papier-Schichten in der Blotting-Apparatur einer elektrischen Spannung ausgesetzt wurde. Nach etwa einer Stunde wurde die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt, wodurch Proteinbanden temporär sichtbar gemacht wurden. Nach dem Entfärben mit TBS-Puffer wurde die Membran meist über Nacht mit einer 0,3-prozentigen BSA-Lösung blockiert. Am nächsten Tag konnte nach einem Waschschrift der spezifische Antikörper appliziert werden, welcher nach einer einstündigen Inkubationsphase durch ein erneutes Waschen entfernt wurde. Da die meisten primären Antikörper einfache Immunglobuline waren, wurde ein zweiter Antikörper zugegeben, welcher mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert war. Dieser konnte mit einer Luminolreaktion anhand des ECL-Systems (Amersham) nachgewiesen werden.

2.2.3.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine weitere Methode zur zielgenauen Identifizierung eines Proteins. Sie liefert die molekulare Masse mit einer Genauigkeit von 0,1 Dalton, welche dann mit dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten theoretischen Wert verglichen werden kann.

Dazu muss das Protein zunächst an einer C4-Reverse-Phase-Säule quantitativ entsalzen werden, indem es in 0,1% Tetrafluoressigsäure auf die Säule aufgetragen und mit einem Acetonitril-Gradienten eluiert wird. Die anschließende massenspektrometrische Analyse wurde in meinem Fall von der Arbeitsgruppe Deutzmann durchgeführt.

2.2.3.6 N-terminale Ansequenzierung

Auch die N-terminale Ansequenzierung mit Hilfe des Edman-Abbaus wird standardmäßig zur Identifikation eines Proteins herangezogen.

Als Proben dienen hierzu Proteine, welche mit Hilfe eines Western Blots auf einer PVDF-Membran immobilisiert wurden, da diese, im Gegensatz zur Nitrozellulose, unter den Bedingungen des Edman-Abbaus stabil bleibt.

Aufgrund der hohen Hydrophobie der Membran wurde diese zunächst 10 Sekunden in 100% Methanol geschwenkt. Nach dem Blotten wurde sie eine Stunde in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt und in PVDF-Entfärber bis auf die Proteinbanden entfärbt. Diese konnten nach einer zwanzigstündigen Inkubation in Wasser ausgeschnitten und zur Ansequenzierung an die Arbeitsgruppe Deutzmann übergeben werden.

2.2.3.7 Crosslink-Assays

Als Crosslink wird ein chemischer Prozess bezeichnet, bei dem zwei oder mehr Moleküle kovalent miteinander verknüpft werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Protein-DNA- als auch Protein-Protein-Crosslinks durchgeführt.

(a) Protein-DNA-Crosslinking

Zu einem Protein-DNA-Gemisch wurden 0,75% Formaldehyd gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Analyse wurde die Probe einer SDS-PAGE unterzogen. Um sowohl Proteinbanden als auch DNA sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

(b) Protein-Protein-Crosslinking

Um etwaige Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachzuweisen, wurden Protein-Protein-Crosslinks durchgeführt. Als Linker wurde in der vorliegenden Arbeit Glutaraldehyd verwendet.

Dabei wurden die putativen Bindungspartner vereinigt und mit variablen Konzentrationen an Glutaraldehyd versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM Tris (pH 7,4) gestoppt und die Probe für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.2.3.8 Analytische Gelfiltration

Eine Möglichkeit, um Interaktionen zwischen Proteinen biochemisch nachzuweisen, ist die analytische Gelfiltration. Das Prinzip der Gelfiltration besteht darin, Proteine der Größe nach aufzutrennen. Um eine mögliche Bindung zweier Proteine zu untersuchen, wird ein Gemisch beider Proteine auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Proteinkomplexe wandern nun schneller durch die Säule als ungebundene Proteine und eluieren gemeinsam. Für diese Methode wurde eine Superdex 75 10/30 Säule verwendet.

Eine weitere Anwendung dieser Methode ist die Analyse der Quartärstruktur von Proteinen.

2.2.3.9 Pulldown-Assays

Diese Methode ist dazu geeignet, stabile Protein-Protein-Bindungen nachzuweisen. Das zugrunde liegende Prinzip ist mit dem der Affinitätschromatographie identisch. Ein Protein, dessen Bindungspartner gesucht ist, wird mit einem Affinitäts-Tag versehen und an ein adäquates Säulenmaterial gebunden. Anschließend wird das mutmaßliche Bindeprotein zugegeben und eine Stunde inkubiert, um eine Interaktion der beteiligten Proteine zu ermöglichen. Um ungebundenes Protein zu entfernen, wird das Material gewaschen. Zuletzt wird mit einem geeigneten Puffer der Proteinkomplex eluiert. Das Ergebnis des Versuchs kann dann über eine SDS-PAGE analysiert werden.

Pull-Down-Assays können sowohl an einer Säule, als auch im Batch-Verfahren durchgeführt werden.

2.2.3.10 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen Proteinen durch die Änderung ihrer Fluoreszenzspektren zu untersuchen. Enthält eines der beiden Interaktionspartner Tryptophane, können diese Aminosäuren als intrinsische Fluorophore dienen. Tyrosine sind zu diesem Zweck weniger geeignet, da deren Fluoreszenz in nativen Proteinen durch Wasserstoffbrücken unterdrückt

wird. Die Emission von Phenylalanin ist im Vergleich eher schwach, weshalb eine Untersuchung dieser Aminosäure selten zum Einsatz kommt.

Gemessen wurde bei einem Anregungsmaximum von Tryptophan von 295 nm. Die Emissionsspektren wurden von 300 nm bis 500 nm aufgenommen. Die Konzentration der eingesetzten Proteinlösung betrug 2 μ M. Die Titration erfolgte durch schrittweise Zugabe des mutmaßlichen Interaktionspartners, wobei die Konzentration des gemessenen Proteins konstant gehalten wurde. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgezeichnet und sowohl Wellenlänge als auch Intensität des jeweiligen Emissionsmaximums bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch einen Vergleich der gemessenen Emissionsmaxima.

2.2.4 NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden mit einem Bruker DRX-600 Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz aufgenommen. Dazu wurde das Programm TOPSPIN (Bruker Analytic GmbH) verwendet, welches auch zum Prozessieren der Primärdaten herangezogen wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm AUREMOL.

2.2.4.1 ^1H -Experimente

Zur Beurteilung der Proteinfaltung und der Probenqualität wurde von allen Proteinen zunächst ein eindimensionales Protonenresonanzspektrum aufgenommen. Um dabei das überlagernde Wassersignal zu vermindern, wurde das Pulsprogramm *zgpgpw5* mit Wasserunterdrückung verwendet.

2.2.4.2 ^{15}N -Trosy-HSQC-Experimente

Für die Titrationsexperimente wurden ^{15}N -HSQC-Messungen (Hetero Single Quantum Coherence) durchgeführt. Bei ^{15}N -HSQC-Experimenten wird die Anregung des ^1H auf den daran gebundenen ^{15}N -Kern und wieder zurück übertragen, so dass man ein zweidimensionales Spektrum erhält, in dem jedes ^1H -Signal mit seiner Protonenresonanzfrequenz in der ersten und die Frequenz des daran gebundenen Stickstoffs in der zweiten Dimension auftaucht. Für die Titrationmessungen wurden

sogenannte TROSY-Messungen durchgeführt, die durch eine deutliche Signalverstärkung die Aufnahme gut aufgelöster Spektren ermöglicht.

Dazu wurden jeweils Spektren eines ^{15}N -markierten Proteins aufgenommen, dem aufsteigende Konzentrationen eines (unmarkierten) putativen Bindungspartners zutitriert wurden. Aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen und den daraus resultierenden Signaländerungen konnte dann auf mögliche Interaktionen geschlossen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen am α -Agglutinin

Mit dem Ziel einer Strukturaufklärung des Hefe-Zellwandproteins Aga2 sollte ein Expressions- und Reinigungssystem etabliert werden, welches es erlaubte, das Protein für NMR-spektroskopische Untersuchungen in hoher Konzentration und Reinheit zu gewinnen. Da es sich hierbei um ein eukaryontisches Protein handelte, welches normalerweise durch posttranslationale Modifikationen mit einer hohen Glykosylierung versehen ist, die bei einer NMR-basierten Strukturbestimmung hinderlich wäre, war hier eine heterologe Expression notwendig. Aus diesem Grund wurde auf *E. coli* Expressionssysteme zurückgegriffen. Dabei kamen nicht nur klassische zelluläre Systeme zum Einsatz, sondern auch eine gekoppelte *In vitro* Transkription/Translation, welche vor allem im Falle schwer löslicher oder toxischer Proteine Vorteile bietet.

3.1.1 Klonierung des Expressionskonstrukts

Zur heterologen Expression in *E. coli* musste das entsprechende Gen zunächst in einen geeigneten Vektor integriert werden. Dabei fiel die Wahl auf das pET-System von Novagen, welches eine für die zellfrei Proteinsynthese notwendige T7-Expressionskassette enthält. Als Vektor wurde pET14b verwendet, da dieser mit einem N-terminalen His-Tag versehen ist, um einer Interaktion mit der C-terminalen $\text{Ag}\alpha$ -Bindedomäne des Proteins vorzubeugen. In Abbildung 7 ist die Aminosäuresequenz des Konstrukts dargestellt. Die Masse beträgt 9,8 kDa.

M G S S H H H H H **S S G L V P R G S H M R** E L T T I C E Q
I P S P T L E S T P Y S L S T T T I L A N G K A M Q G V F E
Y Y K S V T F V S N C G S H P S T T S K G S P I N T Q Y V F

Abb. 7: Aminosäuresequenz von His-Aga2, dargestellt im Ein-Buchstaben-Code. Der His-Tag ist grün, die Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease türkis hinterlegt. Der Rest entspricht der Originalsequenz von Aga2.

3.1.2 *In vivo* und *In vitro* Expression der Konstrukte

3.1.2.1. Expression und Präparation von Aga2

Zur Expression in *E. coli* wurde der Vektor in geeignete Stämme transformiert. Anschließend wurden Expressionstest durchgeführt, um die optimalen Anzuchtbedingungen zu ermitteln. Dabei wurden hohe Expressionsraten erreicht. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich das synthetisierte Zielprotein ausschließlich in denaturiertem Zustand in Einschlusskörperchen, den sogenannten *Inclusion Bodies*, befand. Diese Tatsache machte eine denaturierende Aufreinigung erforderlich, welche mit Hilfe von 6 M Guanidinium-Hydrochlorid (GdmCl) durchgeführt wurde. Die Reinigung erfolgte an einer Ni-NTA-Säule (siehe Abb. 8).

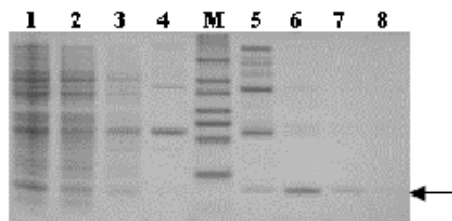


Abb. 8: SDS-Gel einer Reinigung von denaturiertem His-Aga2 mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Das Zielprotein ist mit einem Pfeil markiert. 1: Aufschluss, 2: Durchlauf, 3, 4: Waschen; M: L7 Standard, 5, 6, 7, 8: Elutionsfraktionen.

Da es sich hierbei jedoch um denaturiertes Protein handelte, musste es zur Gewinnung von nativem Zielprotein durch den Entzug von GdmCl rückgefaltet werden. Die dafür geeigneten Pufferbedingungen wurden anhand ausführlicher Testreihen eruiert. Dabei wurden sowohl verschiedene Puffersubstanzen und -konzentrationen, als auch pH-Werte und Salze getestet. Zudem kamen verschiedene Faltungspromotoren, wie zu Beispiel Arginin, zum Einsatz. Die aus diesen Untersuchungen resultierenden optimalen Pufferbedingungen waren 100 mM Na-Acetat mit einem pH-Wert von 5,0, ohne weitere Zusätze. Die unter diesen Bedingungen erreichten Ausbeuten an löslichem, und somit mutmaßlich nativem, His-Aga2 betrugen dabei bis zu 50%.

Eine weitere Möglichkeit, der Bildung von *Inclusion Bodies* entgegenzuwirken, bestand darin, die klassische zelluläre Expression zu umgehen. Die Alternative bestand aus einer Expression *in vitro*, da hier durch die Abwesenheit der für die

Bildung von *Inclusion Bodies* notwendigen Enzyme eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Synthese von nativ gefaltetem Protein besteht.

Um die Exprimierbarkeit von Aga2 zu untersuchen, wurden zunächst Testexpressionen im 30 µl Maßstab durchgeführt. Diese zeigten eine Expression des Zielproteins, welche anhand von Western-Blots nachgewiesen werden konnte. Eine nähere Analyse der Expressionsansätze ergab, dass das Protein fast ausschließlich im unlöslichen und damit denaturierten Zustand vorlag. Es wurden Versuche unternommen, die zellfreie Expression durch Variation im Salz- und DTE-Gehalt oder durch Zugabe diverser Faltungshelfer zu optimieren. Ebenso wurde versucht, die Faltung des Zielproteins durch niedrigere Expressionstemperaturen zu begünstigen. Diese Maßnahmen brachten nicht den gewünschten Erfolg, die Ausbeute an löslichem und gefaltetem Protein blieb gering.

3.1.2.2 Co-Präparation von Aga2 mit Aga1

Wegen der Schwierigkeiten bei der Synthese eines nativ gefalteten, löslichen Zielproteins wurde eine kombinierte Expression der Bindedomäne Aga2 mit der assoziierten Ankerdomäne Aga1 untersucht.

Dazu wurden die Sequenzen für Aga1 und Aga2 in einen pETDuet Vektor (Novagen) eingebracht und anschließend in *E. coli Rosetta pLysS* exprimiert. Mit dieser Methode konnten beide Proteindomänen exprimiert werden, jedoch lagen diese wiederum in denaturierter Form als *Inclusion Bodies* vor. Eine Ausbildung von Heterodimeren konnte nicht nachgewiesen werden. Um dennoch eine Dimerisierung zu erreichen, wurden beide Domänen getrennt denaturierend aufgereinigt und anschließend vereinigt einer Rückfaltung unterzogen. Dieser Versuchsansatz brachte eine signifikante Steigerung der Löslichkeit und Stabilität von Aga (siehe Diplomarbeit Falko Bretfeld). Eine anschließende NMR-spektroskopische Überprüfung des Faltungszustandes ergab jedoch, dass grosse Teile des Proteins ungefaltet waren.

Um eine Dimerisierung der beiden Domänen durch die Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen Aga1 und Aga2 zu gewährleisten, wurde eine Co-Renaturierung mit dem Einsatz eines Oxido-Shuffling-Systems durchgeführt. Dazu wurden wieder beide Proteindomänen getrennt voneinander denaturiert aufgereinigt und anschließend im äquimolaren Verhältnis vereinigt. Vor der eigentlichen Rückfaltung

wurden nun je 100 mM DTT und oxidiertes Glutathion zugegeben, um eine korrekte Bildung der Schwefelbrücken zu ermöglichen. Die Renaturierung erfolgte in 100 mM Na-Acetat-Puffer (pH 4,5). Das Ergebnis dieser Methode ist in Abbildung 9 dargestellt.

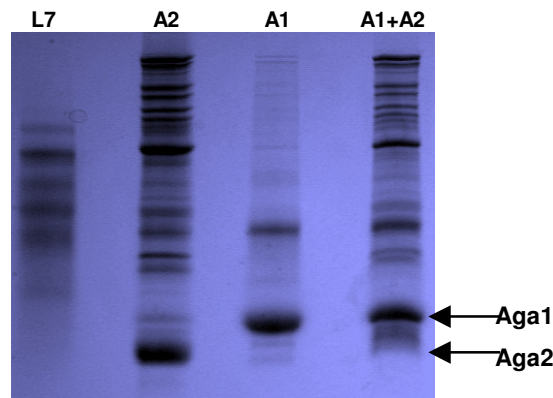


Abb. 9: SDS-Gel einer Rückfaltung von Aga1 und Aga2 mit Hilfe eines Oxido-Shuffling-Systems. Aga1 und Aga2 sind mit Pfeilen markiert. L7: Standard, A1: Aga1-Probe, A2: Aga2-Probe, A1+A2: Überstand des Rückfaltungs-Ansatzes.

Dabei ist zu erkennen, dass im Gegensatz zur Aga1-Bande die Aga2-Bande nach der Rückfaltung nicht mehr nachzuweisen ist. Offensichtlich nahm Aga2 nach der Rückfaltung keinen löslichen Zustand ein, wodurch eine Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken ausgeschlossen werden kann. Eine Verbesserung der Löslichkeit konnte auf diese Weise nicht erreicht werden.

Um ein Dimer aus Aga1 und Aga2 in seinem definitiv nativen Faltungszustand zu erhalten, musste es nativ exprimiert werden. Das Problem einer zellulären Expression lag jedoch in dem reduzierenden Milieu des Cytoplasmas, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit eine Dimerisierung der beiden Proteindomänen erschwert. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Anfügen eines spezifischen N-terminalen Sequenzabschnitts der β -Laktamase eine Translokation der Expressionsprodukte in den periplasmatischen Raum zu erreichen, da hier ein oxidierendes Milieu vorherrscht und entsprechende Enzyme lokalisiert sind, wodurch die Bildung eines Heterodimers ermöglicht werden sollte. Es wurden geeignete Expressionsbedingungen für dieses System ermittelt, jedoch konnte keine ausreichend große Menge des Zielproteins synthetisiert werden. Die Stabilität des Expressionsproduktes war jedoch gegenüber dem renaturierten Protein erhöht, da es

weniger stark zur Aggregation und somit zur Präzipitation neigte (siehe Diplomarbeit Martin Linden).

Eine weitere Möglichkeit der Co-Expression der beiden Aga-Untereinheiten war die zellfreie *In Vitro* Synthese. Dazu wurden beide Domänen in den Vektor pET14b kloniert und zusammen in einem Batchansatz exprimiert. Dieser wurde anschließend in Pellet und Überstand getrennt und anhand eines Western-Blots mit Kontrollansätzen verglichen (siehe Abb. 10). Dabei kann man feststellen, dass Aga1 exprimiert wird und nahezu vollständig unlöslich vorliegt, unabhängig davon, ob es alleine oder zusammen mit Aga2 exprimiert wird.

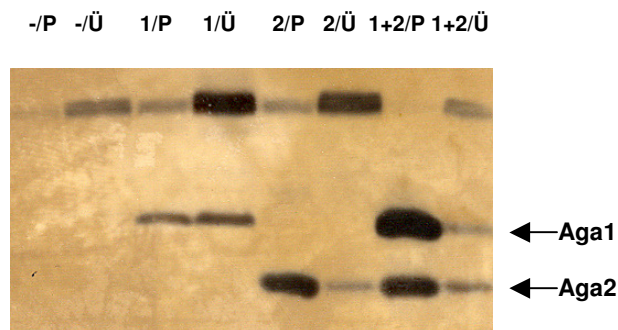


Abb. 10: Western-Blot der *In vitro*-Expression von Aga1 und Aga2. Dargestellt sind die Expressionsansätze, getrennt in Pellet (P) und Überstand (Ü). Verglichen wurde ein Kontrollansatz ohne DNA (-) und Expressionsansätze mit Aga1 (1), Aga2 (2) sowie ein Co-Expressionsansatz (1+2). Die jeweiligen Expressionsprodukte sind mit Pfeilen markiert.

Um eine Ausbildung von Disulfidbrücken bei der zellfreien Synthese zu fördern, wurde eine Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) zu den Expressionsansätzen gegeben. Dies hatte lediglich zu Folge, dass die Expressionsrate zurückging. Ein positiver Einfluss auf die Löslichkeit konnte nicht festgestellt werden.

3.1.2.3 Expression der Mutanten Aga2-F und Aga2-FSS

1997 führten Lipke et al. Aktivitätsmessungen diverser Aga-Mutanten durch, um die für die Bindung an das komplementäre Protein Ag α verantwortliche Domäne zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass einzelne Punktmutationen entgegen den Erwartungen eine höhere Bindeaktivität besaßen als das Wildtypprotein.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde eine Hypothese aufgestellt, gemäß welcher die gesteigerte Aktivität dieser Mutanten auf eine erhöhte Stabilität des Proteins zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen, wurde die Mutation mit der höchsten Bindeaktivität, Y39F, durch gerichtete Mutagenese in das Konstrukt pET14b-Aga2 eingeführt. Anhand eines zellfreien Expressionsansatzes wurde die Mutante Aga2-F mit dem Wildtyp verglichen. Während sich das Wildtypprotein fast ausschließlich im Pellet befand, war fast die Hälfte der Mutante im löslichen Zustand (siehe Abb. 11). Somit konnte durch Mutagenese von Y39 eine Steigerung der Löslichkeit von Aga2 erreicht werden. Des weiteren wurden, ebenfalls durch Mutagenese, die beiden Cysteine an den Positionen 6 und 49 durch Serine ersetzt, um durch Disulfidbrücken bedingte Fehlfaltungen und Aggregationen zu verhindern. Diese Mutante FSS wurde ebenfalls zellfrei exprimiert und mit der Einfachmutante F39 verglichen (siehe Abb. 11). Hier konnte keine weitere Steigerung der Löslichkeit erreicht werden, aber eine Proteinbande auf der Höhe von 20 kDa, welche im Pellet von F39 deutlich zu sehen ist, ist bei FSS nicht mehr nachzuweisen.

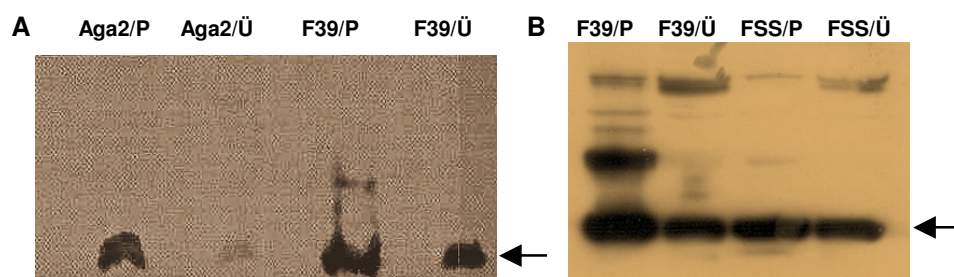


Abb. 11: Western-Blots zellfrei exprimierter Aga2-Varianten (Batchansätze). Verglichen werden Wildtyp-Aga2 (Aga2), die Mutante F39 sowie die Dreifachmutante FSS, getrennt in löslichen (Ü) und unlöslichen (P) Anteil. **A:** Aga2 und F39; **B:** F39 und FSS. Die Höhe der entsprechenden Zielproteine ist mit einem Pfeil markiert.

Zur Quantifizierung der zellfrei synthetisierten Mutante wurde eine Expression im 30 ml Batchansatz mit anschließender Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Proteinausbeute wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE durch einen visuellen

Vergleich der Proteinbanden ermittelt. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigte starke Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen sowie eine geringe Ausbeute an Zielprotein. Diese betrug circa 3,5 µg pro ml Expressionsansatz.

Um zu überprüfen, ob die Stabilität dieser zellfrei synthetisierten Mutante für NMR-spektroskopische Messungen ausreicht, wurde der Einfluss diverser Temperaturen auf das gereinigte Protein bei längerer Exposition untersucht. Dazu wurde ein Ansatz 4 Tage bei 4 °C gelagert, ein weiterer Ansatz eine Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde anhand eines Western-Blots der Anteil an ausgefallenem Protein bestimmt. Dieser betrug in beiden Fällen etwa 50%.

Zur präparativen Proteingewinnung wurde daher eine klassische zelluläre Expression bevorzugt, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Dazu wurde das Konstrukt in geeignete *E. coli* Stämme transformiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Anzucht auf LB_{Carb}-Platten keine Transformanden brachte. Selbst die Verwendung des Stammes Rosetta pLysS, welcher in der Lage ist, eine Basalexpression potentiell toxischer Proteine zu hemmen, führte zu keinem Ergebnis. Erst durch die Zugabe von 1% Glucose, zur weiteren Restriktion einer Laktose-induzierten Expression, konnten Transformanden des Stamms ER2566 erhalten werden.

Anschließend wurde eine Anzucht dieser Klone in LB-Medium durchgeführt, welches ebenfalls 1% Glucose enthielt. Nach Induktion der Kulturen mit 0,1 mM IPTG ließ sich eine signifikante Abnahme der optischen Dichte beobachten, die durch Zellyse verursacht wurde. Lediglich ein Klon des Stammes ER2566 zeigte ein normales Wachstumsverhalten. Eine Analyse seiner Expression zeigte jedoch, dass hier das Zielprotein quantitativ in *Inclusion Bodies* vorlag, was wiederum eine denaturierende Aufreinigung erforderlich machte (siehe Abb. 12). Diese Aufreinigung sowie die darauffolgende Rückfaltung wurde unter den selben Bedingungen durchgeführt, wie sie für die Präparation des Wildtyps eruiert wurden. Im Vergleich zu diesem wurde hier eine signifikant höhere Ausbeute an löslichem Protein erzielt. Diese betrug nach der denaturierenden Reinigung 74 mg/l Kultur, wovon 55 mg/l Kultur nach der Rückfaltung in löslicher Form vorlagen. Dies entspricht einer Renaturierungsausbeute von 74%.

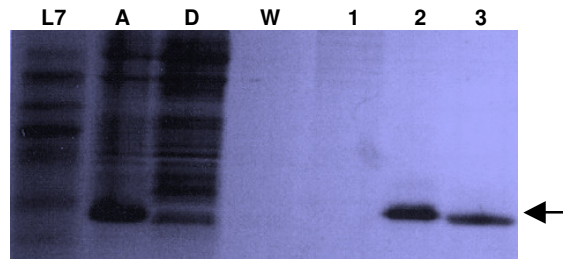


Abb. 12: SDS-Gel einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie der Aga2-Mutante FSS. Aufgetragen sind ein Proteinmarker (L7) sowie je ein Aliquot des Zellextrakts (A), des Säulendurchlaufs (D) des Waschschrtes (W) und der Elutionsfraktionen (1, 2, 3). Das Zielprotein ist mit einem Pfeil markiert.

3.1.3 Analytik der Expressionsprodukte

3.1.3.1 Massenspektrometrie und N-terminale Ansequenzierung

Zur Verifizierung der Identität des gewonnenen Proteins wurde zunächst eine massenspektroskopische Untersuchung vorgenommen. Diese ergab eine molekulare Masse von 9626 Dalton, was einer Abweichung von 131 Dalton gegenüber dem theoretisch errechneten Wert darstellt. Da diese Differenz exakt der Masse von Formyl-Methionin entspricht, wurde das Protein N-terminal ansequenziert, um zu überprüfen, ob es im Laufe der Proteinsynthese zu einer posttranslationalen Abspaltung des N-terminalen Formyl-Methionins kommt. Das Resultat dieser Analyse war die Sequenz GSSHHH, was exakt den N-Terminus von His-Aga2-FSS ohne Formyl-Methionin darstellt.

3.1.3.2 Sekundärstrukturvorhersage von Aga2

Mit dem Programm *PSIPRED* [McGufin et al., 2000] wurde eine theoretische Vorhersage der Sekundärstruktur von His-Aga2 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

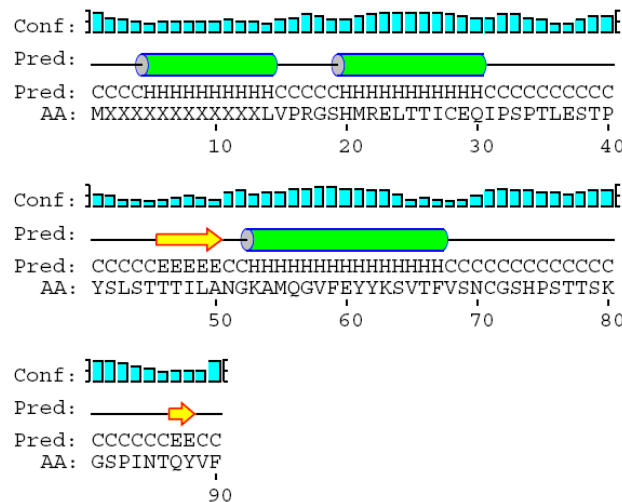


Abb. 13: Sekundärstrukturvorhersage von His-Aga2 mit dem Programm PSIPRED. Dargestellt ist die Proteinsequenz (AA), die Sekundärstrukturelemente (Pred) sowie die Zuverlässigkeit der Vorhersage (Conf). α -helikale Bereiche sind grün, β -Faltblattstrukturen gelb dargestellt.

Diese Vorhersage ergab, dass das Protein mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit zwei α -helikale Bereiche besitzt, zwischen His20 und Glu30 sowie von Lys53 bis Phe67. Mit weitaus geringeren Wahrscheinlichkeiten wurden zudem zwei Bereiche mit β -Faltblattstruktur vorhergesagt.

Eine CD-spektroskopische Untersuchung der Mutante Aga2-FSS zur experimentellen Überprüfung dieser Vorhersage ergab dagegen einen α -Helix Gehalt von annähernd 100%, was allerdings auch auf etwaige DNA-Verunreinigungen zurückzuführen sein könnte. Eine Wiederholung dieser Messung zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde aus organisatorischen Gründen nicht durchgeführt.

3.1.3.2 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration bietet die Möglichkeit, die Quartärstruktur eines Proteins zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde die Mutante Aga2-FSS auf eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die erhaltenen Fraktionen wurden anhand einer SDS-PAGE in Kombination mit dem Säulenchromatogramm ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

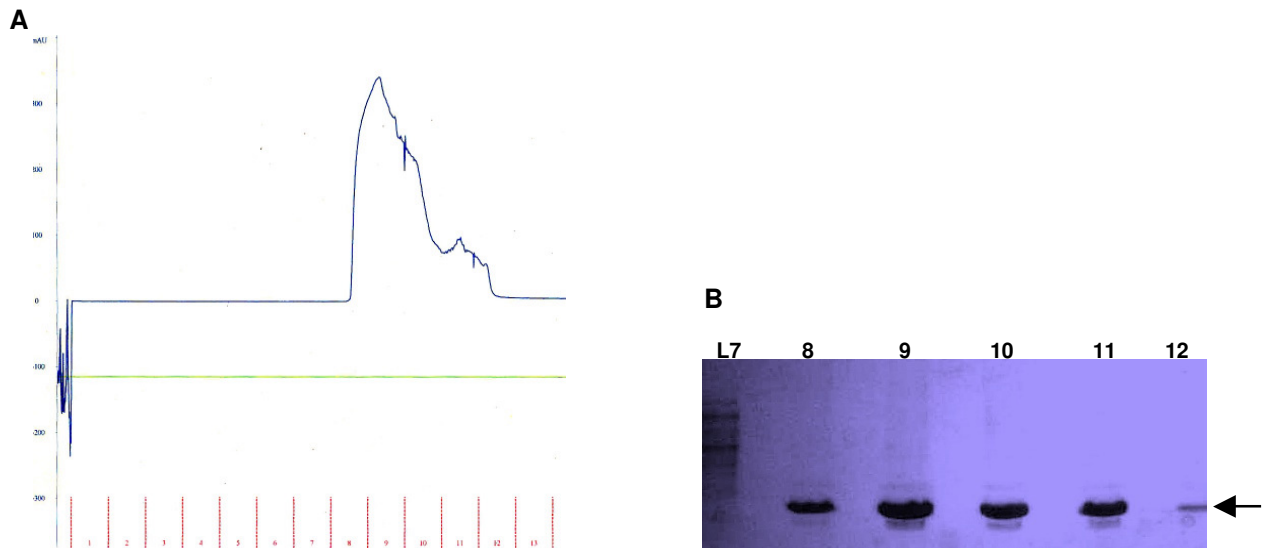


Abb. 14: Ergebnisse der Analytischen Gelfiltration von renaturiertem Aga2-FSS in 100 mM Na-Acetat (pH 5), durchgeführt an einer Superdex 10/30 Säule. **A:** Dargestellt ist das Chromatogramm des Säulenlaufs. In x-Richtung sind die Fraktionen, in Y-Richtung relative Absorptionseinheiten aufgetragen. **B:** SDS-PAGE der Fraktionen 8 bis 11. Aga2-FSS ist mit einem Pfeil markiert.

Dabei zeigt das Chromatogramm eine Reihe ineinander laufender Absorptionsmaxima, wobei das erste Signal direkt nach dem V_0 von 7,77 ml erscheint. Die Analyse einzelner Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass es sich bei allen Peaks um das Zielprotein handelte. Dies deutet darauf hin, dass das Protein in Aggregaten vorliegt, welche unterschiedliche Größen aufweisen.

3.1.3.3 NMR-Spektroskopie

Um qualitative Aussagen über den Faltungszustand von Aga2-FSS machen zu können, wurde ein eindimensionales Protonenresonanzspektrum aufgenommen (siehe Abb. 15). Dieses Spektrum zeigt viele starke Signale, die durch Verunreinigungen verursacht werden. Im Bereich zwischen 6 und 9 ppm sind im wesentlichen drei Signale zu sehen, welche eine sehr breite Basis aufweisen. Dies wird im allgemeinen mit Aggregationen in Verbindung gebracht, die wiederum auf ungefaltete Bereiche des Proteins zurückzuführen sind.

Aufgrund dieser Resultate wurde von einer weiteren Untersuchung dieses Proteins mit dem Ziel einer NMR-spektroskopischen Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur zunächst abgesehen.

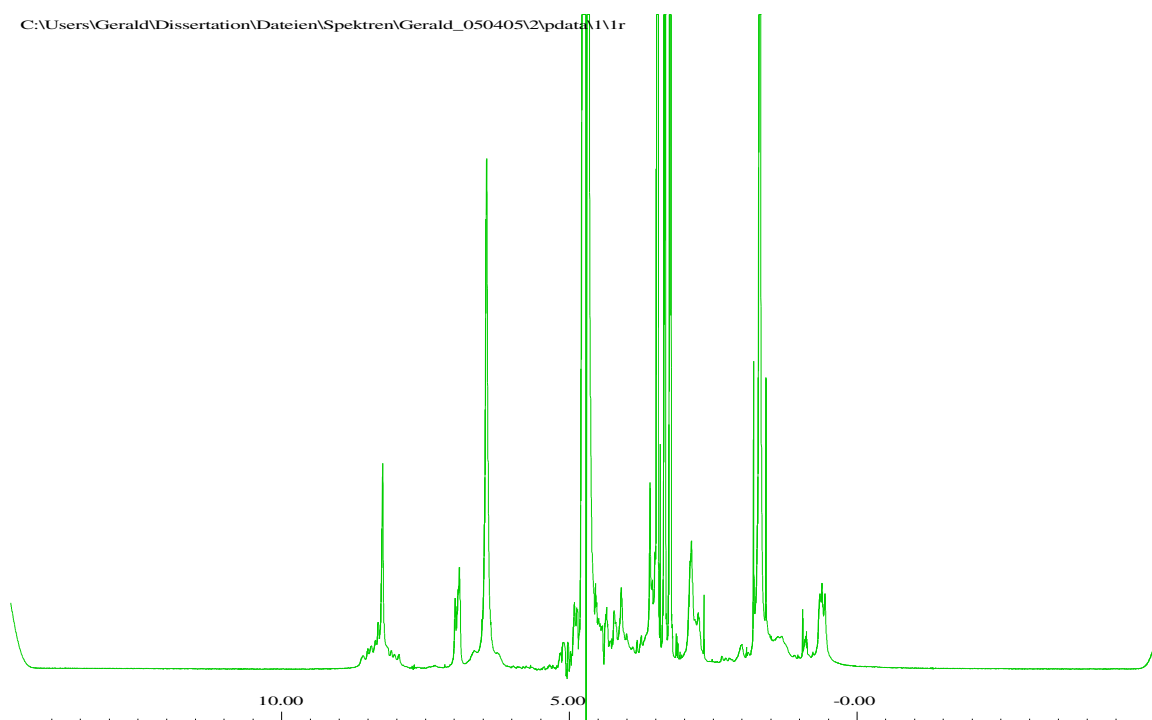


Abb. 15: Eindimensionales Protonenresonanzspektrum von renaturiertem Aga2-FSS in 100 mM Na-Acetat-Puffer bei pH 5. Aufgenommen wurde das Spektrum bei 600 MHz und 283 K.

3.2 Untersuchung der Interaktion von ZO-1 und AF6

3.2.1 Klonierung von ZO-1-Domänen

Da zu Beginn der Arbeit kein adäquates Expressionskonstrukt vorhanden war, musste die gewünschte cDNA durch reverse Transkription (RT) synthetisiert werden. Die dazu benötigte mRNA wurde aus tiefgefrorener Rattenleber präpariert. Als Primer für die RT wurde zunächst ein Poly-U-Oligonukleotid verwendet, was sich jedoch als unpassend herausstellte, da die hieraus gewonnene cDNA für die meisten der geplanten Konstrukte zu kurz war. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf spezifische Primer, die ursprünglich für die nachfolgende PCR bestimmt waren, in die RT eingesetzt, was sich letztendlich als zielführend erwies. Die daraus erhaltenen PCR-Produkte waren die Basis für nachfolgende Klonierarbeiten.

Zur Expression in *E. coli* wurden diese DNA-Fragmente in geeignete Vektoren eingebracht. Diese mussten sowohl eine starke Expression gewährleisten als auch einen Affinitäts-Tag zur leichteren Aufreinigung besitzen. Die Vektoren pET20 und pGEX4T1 erfüllten beide Anforderungen, wobei letzterer durch seinen positiven Einfluss auf die Löslichkeit des Zielproteins bevorzugt eingesetzt wurde.

Sämtliche Konstrukte, die aus diesen Klonierungsarbeiten hervorgingen, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Konstrukt- Bezeichnung	Konservierte Domänen	Aminosäuren	Molekulare Masse
AF6(1-141)	RBD	1 bis 141	16,4 kDa
AF6(36-206)	RBD	36 bis 206	19,9 kDa
ZO-1-k	3 PDZ, SH3, GuK	1 bis 862	96,1 kDa
SH3-I	SH3	503 bis 643	16,4 kDa
SG	SH3, GuK	516 bis 794	31,3 kDa
P2P3	PDZ2, PDZ3	186 bis 502	34,8 kDa
P3	PDZ3	421 bis 502	9,1 kDa
P2*	PDZ2	186 bis 420	26,0 kDa

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Expressionskonstrukte. Neben der jeweiligen Konstruktbezeichnung sind die enthaltenen konservierten Domänen, die Aminosäuren sowie die theoretische molekulare Masse der Proteine angegeben. RBD = Ras-Bindedomäne, PDZ = PDZ-Domäne, SH3 = SH3-Domäne, GuK = Guanylat-Kinase-Domäne.

3.2.2 Expressionen und Präparationen von ZO-1- und AF6-Domänen

Für die geplanten Interaktionsstudien mussten die erzeugten Konstrukte exprimiert werden. Da speziell für NMR-Experimente nativ gefaltete Proteine in hoher Konzentration und hohem Reinheitsgrad benötigt wurden, mussten zunächst durch zahlreiche Tests geeignete Bedingungen bezüglich Expression und Aufreinigung eruiert werden.

3.2.2.1 AF6-Domänen

Für die Interaktionsexperimente wurden uns von der Arbeitsgruppe von Christian Herrmann (MPI Dortmund) diverse AF6-Expressionskonstrukte zur Verfügung gestellt, von denen zwei Exemplare verwendet wurden. AF6(1-141), welches die Ras-Bindedomäne darstellt und eine molekulare Masse von 16,4 kDa besitzt und AF6(36-206), das der mutmaßlichen Zo1-Bindedomäne entspricht, mit einer molekularen Masse von 19,9 kDa.

Um die idealen Expressionsbedingungen für diese Domänen festzustellen, wurden Testexpressionen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass AF6 bei hohen Temperaturen und langer Expressionsdauer zum Großteil im denaturierten Zustand in der Zelle vorliegt. Aus diesem Grund wurde die Expressionstemperatur auf 30 °C festgelegt, die Dauer der Expression sollte vier Stunden nicht überschreiten. Induziert wurde mit einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM.

Beide AF6-Domänen lagen als GST-Fusionsproteine vor, das heißt, sie konnten mit Hilfe der GSH-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Existenz einer Thrombin-Schnittstelle zwischen Fusions- und Zielprotein erlaubte es, durch einen Verdau auf der Säule AF6 in hoher Reinheit zu gewinnen, wenngleich mit dieser Methode die Ausbeute an verdautem Zielprotein mit 2,4 mg/l relativ gering war (siehe Abb. 16).

Wurde der Thrombin-Verdau erst nach Elution des Fusionsproteins durchgeführt, resultierte das zwar in einer wesentlich besseren Ausbeute. Dies war jedoch mit starken Verunreinigungen verbunden, welche weitere Reinigungsschritte erforderlich machten. Da hierbei wiederum mit starken Verlusten gerechnet werden musste, fand diese Methode keine weitere Verwendung.

Um das Protein für bestimmte NMR-Experimente ¹⁵N-markiert zu synthetisieren, wurde eine Expression in Minimalmedium durchgeführt. Dazu musste zunächst durch

Testexpressionen ein geeignetes Medium gefunden werden. Es wurden das Minimalmedium nach Neidhardt und das NMM-Medium getestet, wobei das Neidhardt-Medium eine höhere Expressionsrate aufwies. Eine präparative Expression in Neidhardt-Minimalmedium mit 0,5 g/l ^{15}N -gelabelten Ammoniumchlorid ergab eine Ausbeute an markiertem AF6 von 1,7 mg/l Medium.

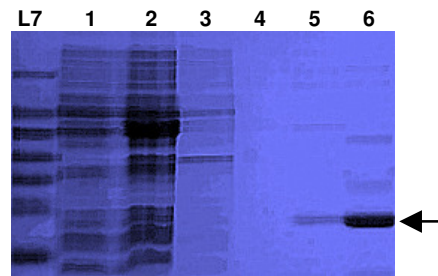


Abb. 16: SDS-Gel der Affinitätschromatographie von AF6(1-141) mittels GSH-Sepharose. Neben dem Standard sind eine Nullprobe (1), der Zellextrakt (2) der Waschschrift (3) sowie die Elutionsfraktionen (4, 5, und 6) aufgetragen. Das Zielprotein ist mit einem Pfeil markiert.

3.2.2.2 Das ZO-1-Konstrukt SH3-I

Da die AF6-Bindestelle zunächst in der Umgebung der SH3-Domäne von ZO-1 vermutet wurde, wurde ein erweitertes SH3-Konstrukt (SH3(I)) hergestellt, welches vom Ende der dritten PDZ-Domäne bis zum Anfang der GuK-Domäne reichte, also von Aminosäure 503 bis 643. Das daraus resultierende Protein besitzt somit eine theoretische molekulare Masse von 16,4 kDa (siehe Abb 17).

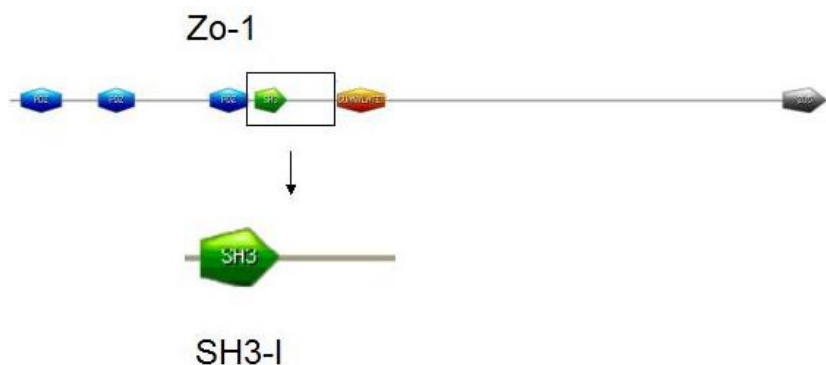


Abb. 17: Schematische Darstellung der ZO-1 Domäne SH3(I). Oben ist ZO-1 dargestellt, unten das Konstrukt SH3(I). PDZ-Domänen sind blau, die SH3-Domäne grün, die GuK-Domäne orange und die ZU5-Domäne grau markiert. Die Lokalisation des Konstruktes in der Originalsequenz ist mit einem Kästchen markiert.

Als Vektoren wurden pET20 (mit N-terminalen His-Tag) und pIVEX (mit C-terminalen His-Tag) ausgewählt. Es wurden Testexpressionen durchgeführt, um das Konstrukt mit der besten Expression zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass pIVEX-SH3(I) sehr schlecht exprimiert, während pET20-SH3(I) eine sehr starke Expression aufwies, jedoch nur in *E. coli* Rosetta pLysS (siehe Abb. 18). Es wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Expressionsdauer auf bis zu zwei Tage ausgedehnt.

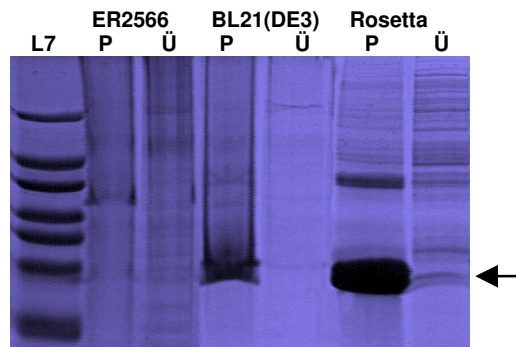


Abb. 18: SDS-Gel von SH3-I-Testexpressionen in den *E. coli*-Stämmen ER2566, BL21(DE3) und Rosetta pLysS. Aufgetragen sind Aliquots der Zellaufschlüsse, getrennt in Pellet (P) und Überstand (Ü). Die Höhe des Zielproteins ist mit einem Pfeil markiert. L7 stellt den Proteinstandard dar.

Löslichkeitstests ergaben, dass sich das gesamte Zielprotein unlöslich in *Inclusion Bodies* befand. Dafür lag es bereits in sehr hoher Reinheit vor, welche sich mit dem Lösen der *Inclusion Bodies* in 6 M Guanidinium Hydrochlorid (GdmCl) noch weiter verbesserte (siehe Abb. 19).

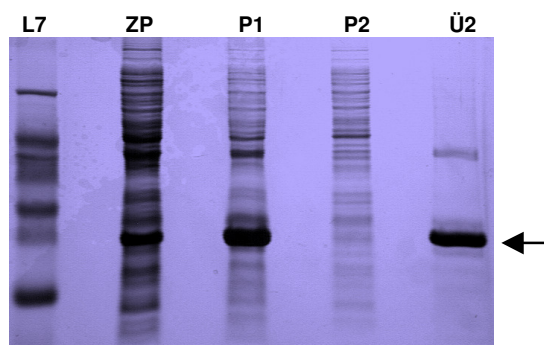


Abb. 19: SDS-PAGE der Reinigung von SH3-I. Aufgetragen sind das Zellpellet (ZP), das Pellet nach Zellaufschluss (P1) sowie Pellet (P2) und Überstand (Ü2) nach Behandlung mit 6 M GdmCl. Die Höhe des Zielproteins ist mit einem Pfeil markiert. L7: Proteinstandard.

Um das Protein in seinen nativen Zustand zu überführen, musste es zurückgefaltet werden. Die dafür optimalen Bedingungen wurden mit Hilfe von Rückfaltungsscreenings ermittelt, wobei neben verschiedenen Salzkonzentrationen auch Faltungshelfer, wie Ammoniumsulfat oder Arginin, zum Einsatz kamen (siehe Abb. 20). Dabei erwies sich ein 100 mM Na-Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 als ausreichend, um eine Ausbeute von mehr als 50% zu erreichen. Zudem konnte durch die Rückfaltung eine weitere Verbesserung des Reinheitsgrades erreicht werden, was eine klassische Aufreinigung des Proteins praktisch überflüssig machte. So konnten bedingt durch die hohe Expressionsrate und dem geringen Reinigungsverlust sehr hohe Ausbeuten erzielt werden.

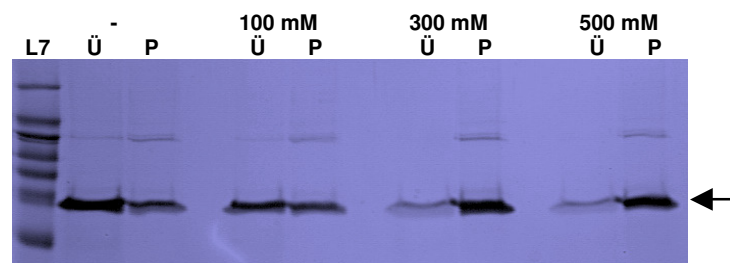


Abb. 20: SDS-PAGE des Renaturierungs-Screens von denaturierend gereinigtem SH3-I. Untersucht wurde der Einfluss verschiedener NaCl-Konzentrationen auf die Löslichkeit des Zielproteins (Pfeil). Aufgetragen sind Pellet (P) und Überstand (Ü) der Ansätze. NaCl-Konzentrationen sind angegeben. L7: Standard.

Für das Ziel, NMR-spektroskopische Untersuchungen durchzuführen, musste das Protein isotopenmarkiert vorliegen. Zu diesem Zweck wurden Testexpressionen in Minimalmedien durchgeführt. Dabei stellte sich das Minimalmedium nach Neidhardt als geeignet heraus. Die Ausbeute an gereinigtem und konzentriertem Protein betrug hierbei 30 mg/100 ml Kultur.

3.2.2.3 Das ZO-1-Konstrukt SG

Da sich die Präparation eines löslichen und nativ gefalteten SH3-Konstruktes als schwierig erwies, wurde ein Konstrukt angefertigt, das sowohl die SH3- als auch die GuK-Domäne beinhaltete. Diese als SG benannte Domäne reicht von Aminosäure 516 bis Aminosäure 794 und besitzt eine molekulare Masse von 31,3 kDa (siehe

Abb. 21). Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pGEX4T1 ausgewählt, das ein N-terminales GST-Fusionsprotein (25 kDa) enthielt, wodurch man sich eine zusätzliche Steigerung der Löslichkeit versprach.

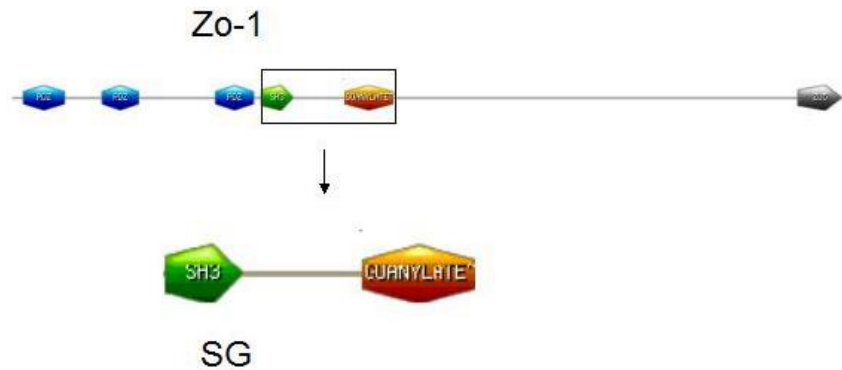


Abb. 21: Schematische Darstellung der ZO-1 Domäne SG. Oben ist ZO-1 dargestellt, unten das Konstrukt SG. PDZ-Domänen sind blau, die SH3-Domäne grün, die GuK-Domäne orange und die ZU5-Domäne grau markiert. Die Lokalisation des Konstruktes in der Originalsequenz ist mit einem Kästchen markiert.

Testexpressionen ergaben, dass sich das Protein erst bei einer Expressionstemperatur von maximal 25°C zu etwa 10% in einem löslichen Zustand befand.

Ebenso hatte die Expressionsdauer einen Einfluss auf die Löslichkeit. Inkubationen von mehr als drei Stunden erhöhten dabei den Anteil an unlöslichen Protein, während der lösliche Anteil unverändert blieb. Auch ein Absenken der IPTG-Konzentration zur Induktion auf 0,1 mM erwies sich hinsichtlich der Löslichkeit als vorteilhaft. All diese Maßnahmen hatten schließlich zur Folge, dass die Gesamtausbeute an nativem SG sehr gering ausfiel.

Zur Reinigung wurde eine Affinitätschromatographie an einer GSH-Sepharose-Säule durchgeführt (siehe Abb. 22). Dabei befand sich ein Großteil des Zielproteins im Durchlauf, das heißt, die Bindung an die Säule war unzureichend. Eine photometrische Untersuchung des Eluats nach Thrombin-Verdau ergab einen Quotienten aus 260 nm und 280 nm von 1,9, was auf starke DNA-Verunreinigungen hindeutete. Diese konnten auch durch eine vorangeschaltete Behandlung mit DNase nicht entfernt werden. Die Gesamtausbeute an Zielprotein wurde nicht bestimmt, da sie zu gering war und das Protein zudem nicht in Reinform vorlag.

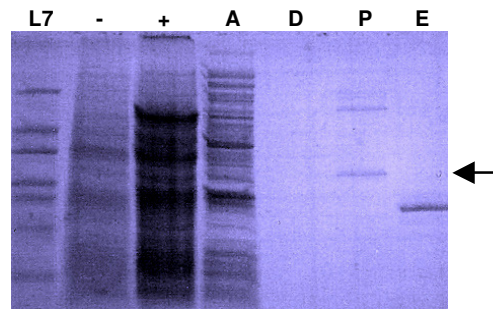


Abb. 22: SDS-Gel der Affinitätschromatographie des ZO-1 Konstrukts SG mittels GSH-Sepharose. Aufgetragen sind neben dem Standard (L7) je ein Aliquot der Nullprobe (-), des Zellpellets nach Expression (+), des Zellextrakts (A), des Säulendurchlaufs (D), des Proteinpools nach Thrombinverdau (P) sowie des Eluats (E). Die Höhe des Zielproteins ist mit einem Pfeil markiert.

3.2.2.4 Das ZO-1-Konstrukt P2P3

Um einen größeren Bereich abzudecken, der für eine Interaktion mit AF6 in Frage kommen könnte, wurde ein Konstrukt erzeugt, das sich von der zweiten bis zur dritten PDZ-Domäne erstreckte (siehe Abb. 23). Diese P2P3-Domäne reichte somit von K186 bis K502 und hatte eine molekulare Masse von 34,8 kDa.

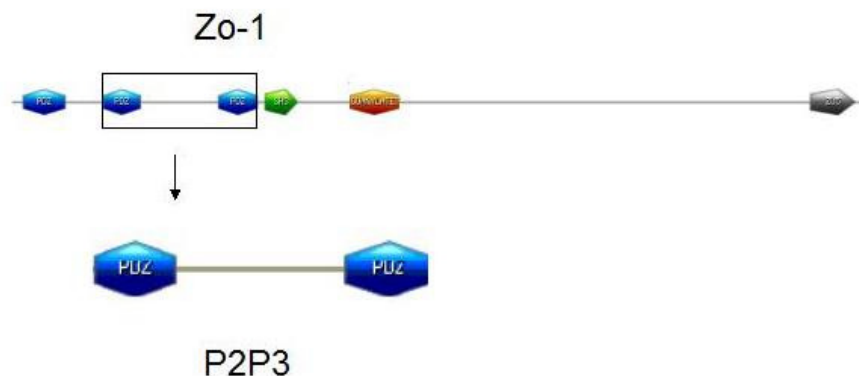


Abb. 23: Schematische Darstellung der ZO-1 Domäne P2P3. Oben ist ZO-1 dargestellt, unten das Konstrukt P2P3. PDZ-Domänen sind blau, die SH3-Domäne grün, die GuK-Domäne orange und die ZU5-Domäne grau markiert. Die Lokalisation des Konstruktes in der Originalsequenz ist mit einem Kästchen markiert.

Als Expressionsvektor wurde auch hier das Plasmid pGEX4T1 verwendet. Es wurden zahlreiche Expressionstest durchgeführt, bei welchen geeignete Expressionsbedingungen eruiert wurden. So wurde nach dem besten Expressionsstamm gesucht, sowie Wachstumstemperatur und –dauer ermittelt. Die

besten Ergebnisse konnten dabei mit dem E. coli-Stamm BL21(DE3) erzielt werden, und zwar bei einer Expressionstemperatur von 30 °C. Die Dauer der Inkubation sollte 4 Stunden nicht überschreiten, da es sonst zu einem erhöhtem Anteil an ungefaltetem Protein kommt. Induziert wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM.

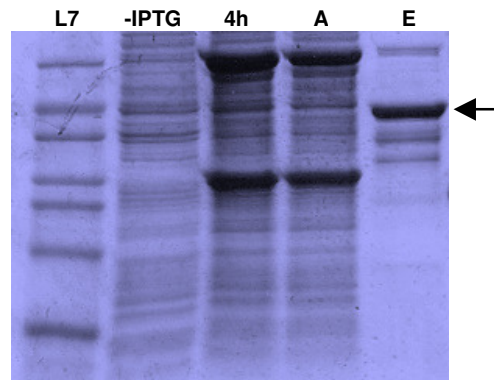


Abb. 24: SDS-PAGE der Reinigung von P2P3 mittels GSH-Affinitätschromatographie. Aufgetragen sind der Proteinstandard (L7), eine Nullprobe (-IPTG), das Zellpellet nach 4-stündiger Expression (4h), der Zellextrakt (A) sowie das Eluat (E). Das Zielprotein ist mit einem Pfeil markiert.

Die Reinigung des Proteins erfolgte mit Hilfe einer GSH-Sepharose-Säule (siehe Abb. 24). Durch einen Thrombin-Verdau, welcher an der Säule durchgeführt wurde, konnte eine hohe Reinheit des Zielproteins erreicht werden, was weitere Reinigungsschritte unnötig machte. Die Ausbeute an gereinigtem P2P3 betrug hierbei 5 mg/l.

3.2.2.5 Das ZO-1-Konstrukt P3

Das als P3 bezeichnete Konstrukt entspricht genau der dritten PDZ-Domäne von ZO-1 und reicht von Aminosäure 421 bis Aminosäure 502 (siehe Abb. 25). Das Protein hat somit eine Länge von 82 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 9,1 kDa.

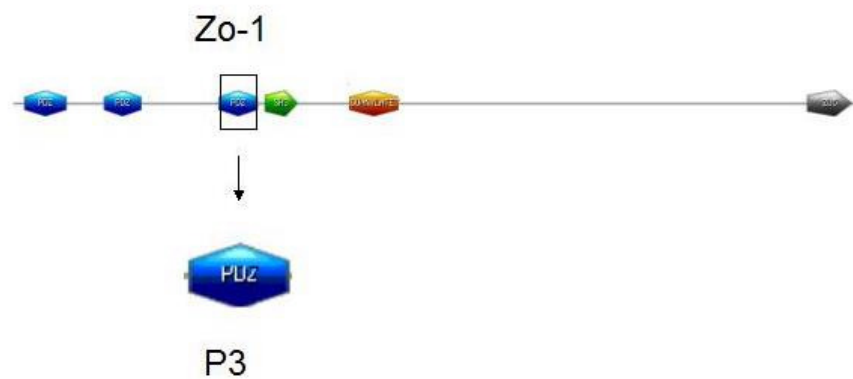


Abb. 25: Schematische Darstellung der ZO-1 Domäne P3. Oben ist ZO-1 dargestellt, unten das Konstrukt P3. PDZ-Domänen sind blau, die SH3-Domäne grün, die GuK-Domäne orange und die ZU5-Domäne grau markiert. Die Lokalisation des Konstruktes in der Originalsequenz ist mit einem Kästchen markiert.

Als Expressionsvektor kam auch hier pGEX4T1 zum Einsatz. Es wurden Expressionstests durchgeführt, mit deren Hilfe ein geeigneter Expressionsstamm und optimale Anzuchtbedingungen ermittelt wurden. Dabei brachte der E.coli-Stamm CK600K die besten Resultate. Zudem ergaben die Tests, dass sich dieses Protein bei einer Temperatur von 37°C exprimieren lässt, ohne dabei in signifikantem Ausmaß auszufallen. Doch auch hier war die Dauer auf 4 Stunden beschränkt, da es sonst doch zu einem erhöhten Anteil an ungefaltetem Protein kam. Die IPTG-Konzentration wurde auf 0,1 mM festgelegt, was ebenfalls einen Kompromiss zwischen hoher Expressionsrate und guter Löslichkeit darstellte.

Die Reinigung des Proteins an einer GSH-Sepharose-Säule erwies sich als unproblematisch. Es wurden Ausbeuten von 3,8 mg/L Kultur erzielt (siehe Abb. 26).

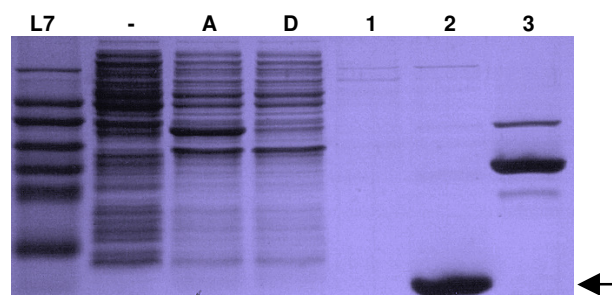


Abb. 26: SDS-Gel der Aufreinigung von P3 mittels GSH-Sepharose. Aufgetragen sind der Größenstandard (L7), eine Nullprobe (-), der Zellextrakt (A), der Säulendurchlauf (D) die Fraktionen nach Thrombin-Verdau (1, 2) sowie das Eluat (E). Das Zielprotein ist mit einem Pfeil markiert.

3.2.2.6 Das ZO-1-Konstrukt P2⁺

Als P2⁺ wurde ein Konstrukt bezeichnet, das von Aminosäure 186 bis Aminosäure 420 reicht. Es beinhaltet somit die zweite PDZ-Domäne von ZO-1 und den kompletten Bereich zwischen PDZ2 und PDZ3 (siehe Abb. 27). Seine molekulare Masse beträgt 26,0 kDa.

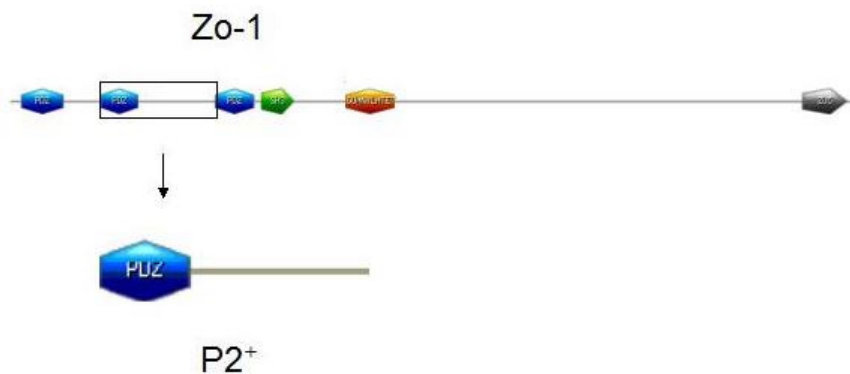


Abb. 27: Schematische Darstellung der ZO-1 Domäne P2⁺. Oben ist ZO-1 dargestellt, unten das Konstrukt P2⁺. PDZ-Domänen sind blau, die SH3-Domäne grün, die GuK-Domäne orange und die ZU5-Domäne grau markiert. Die Lokalisation des Konstruktes in der Originalsequenz ist mit einem Kästchen markiert.

Auch diese Domäne wurde in den Vektor pGEX4T1 kloniert, da mit diesem die bisher besten Ausbeuten erzielt wurden. Es wurden die üblichen Expressionstests durchgeführt, welche eine sehr gute Löslichkeit des Proteins ergaben. Dies ermöglichte Expressionen bei 37°C von über 20 Stunden (siehe Abb. 28). Der Stamm BL21(DE3) zeigte dabei die höchste Expressionsrate.

Gereinigt wurde das Protein auch hier mittels einer GSH-Sepharose-Säule (siehe Abb. 29). Dabei zeigte sich ein großer Anteil an ungebundenem Protein im Durchlauf. Die Ausbeute an Zielprotein war mit 0,7 mg/L für NMR-spektroskopische Untersuchungen dennoch ausreichend. Die Reinheit des Proteins war im Falle dieses Konstrukts nach der GSH-Chromatographie nicht ausreichend, weshalb eine Gelfiltration notwendig war. Diese hatte eine quantitative Entfernung aller Verunreinigungen zur Folge.

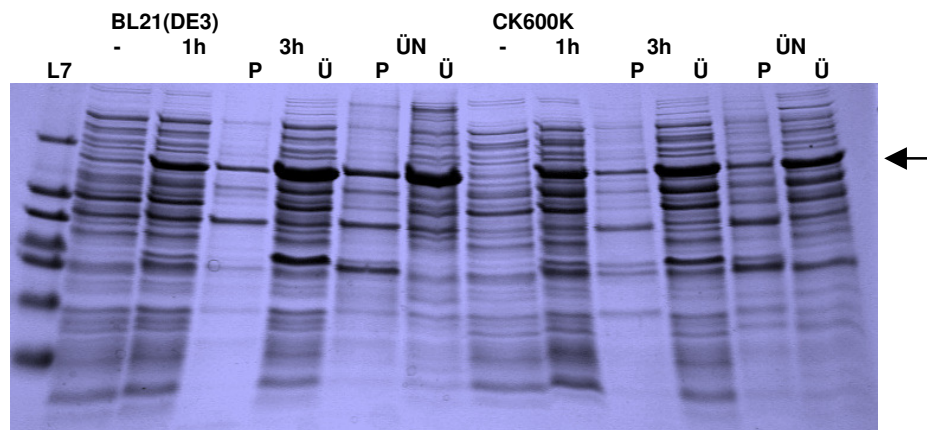


Abb. 28: Ergebnis der Expressionstests von $P2^+$, dargestellt in Form eines SDS-Gels. Untersucht wurden die Expressionsstämme BL21(DE3) und CK600K sowie der Einfluss der Expressionsdauer auf Löslichkeit und Ausbeute. Aufgetragen sind jeweils Pellet (P) und Überstand (Ü) der Zellpellets nach einer Expression von 3 Stunden (3h) und über Nacht (ÜN). Die Nullprobe sowie der einstündige Expressionsansatz sind unaufgeschlossen aufgetragen. Die Höhe des Zielproteins ist mit einem Pfeil markiert. L7: Protein-Größenstandard.

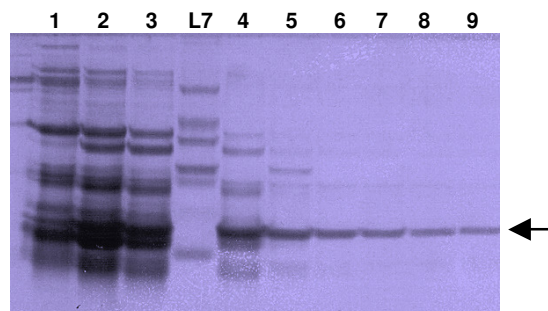


Abb. 29: SDS-PAGE der GSH-Affinitätschromatographie von $P2^+$. Aufgetragen wurden die Fraktionen (1 bis 9) nach Thrombin-Verdau. Der Proteinmarker ist als L7 bezeichnet, die Höhe des Zielproteins ist mit einem Pfeil markiert.

Zur zielsicheren Identifizierung des Proteins wurde eine N-terminale Ansequenzierung durchgeführt. Diese ergab die Sequenz GSTLVTKVKSR, wobei die ersten beiden Aminosäuren einen Teil der Thrombin-Erkennungssequenz darstellen, während die restlichen Aminosäuren exakt dem N-Terminus von $P2^+$ entsprechen.

3.2.2.7 Das ZO-1-Konstrukt ZO1-k

Von der Arbeitsgruppe um Kozo Kaibuchi wurde ein Konstrukt bereitgestellt, welches die N-terminale Hälfte von ZO-1 darstellt. Es reicht somit von Aminosäure 1 bis 862 und beinhaltet alle drei PDZ-Domänen sowie die SH3- und die GuK-Domäne (siehe Abb. 30). Seine molekulare Masse entspricht 96,1 kDa.

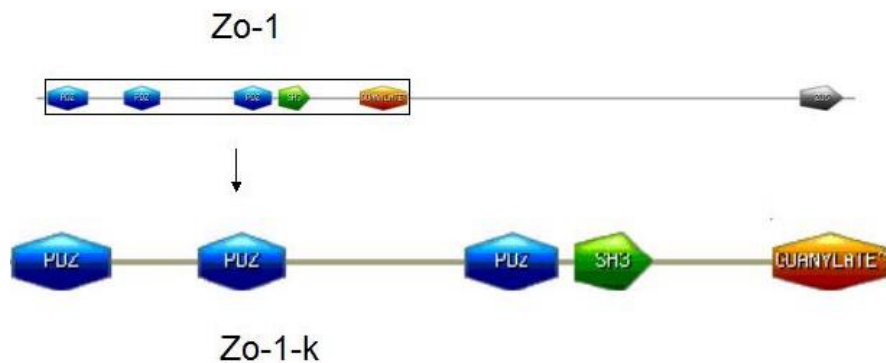


Abb. 30: Schematische Darstellung der ZO-1 Domäne Zo1-k. Oben ist ZO-1 dargestellt, unten das Konstrukt Zo1-k. PDZ-Domänen sind blau, die SH3-Domäne grün, die GuK-Domäne orange und die ZU5-Domäne grau markiert. Die Lokalisation des Konstruktes in der Originalsequenz ist mit einem Kästchen markiert.

Da es sich auch hierbei um ein GST-Fusionsprotein handelt, wurde die Aufreinigung ebenfalls mittels GSH-Affinitätschromatographie durchgeführt.

Zur Ermittlung optimaler Expressionsbedingungen wurden auch hier Expressionstests durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Protein zum Großteil löslich war, während die Expressionsraten eher gering ausfielen. Außerdem waren anhand eines Western-Blots zahlreiche Banden zu erkennen, welche ein geringeres Molekulargewicht aufwiesen, was auf einen starken proteolytischen Abbau des Zielproteins hindeutete. Zur Steigerung der Expressionsraten und Optimierung der Ausbeute wurden daher zahlreiche Maßnahmen unternommen. So wurde durch Variation der IPTG-Konzentration versucht, die Expressionsrate zu steigern. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, brachte eine Induktion mit IPTG keine Expressionssteigerung. Dafür ergab dieser Versuch, dass eine reine Basalexpression des Zielproteins ohne IPTG eine Minimierung des Proteinabbaus bewirkte, ohne dabei die Expressionsrate signifikant zu verringern. Präparative Expressionsansätze wurden daraufhin ohne Induktion mit IPTG durchgeführt. Da die

Zellen nach einer Expression über Nacht mit OD_{600} von 4,2 eine viermal höhere optische Dichte erreichten, als nach einer Stunde, wurde auch zu präparativen Zwecken über Nacht exprimiert.

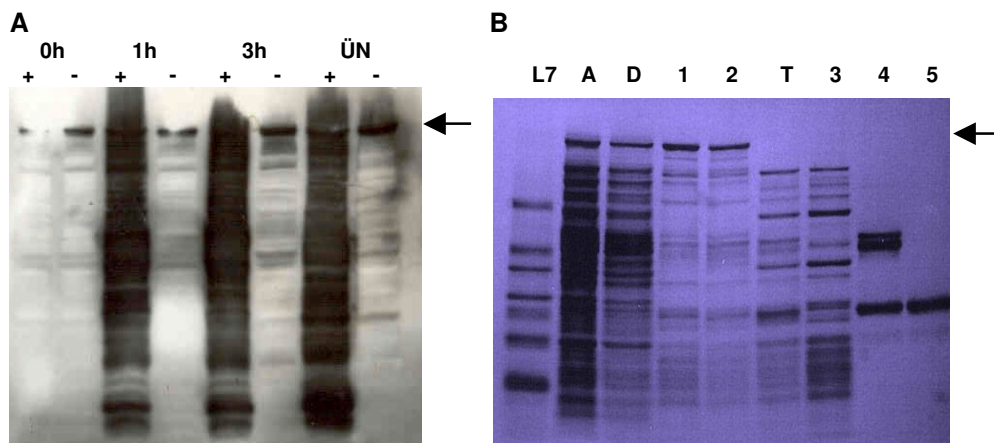


Abb. 31: Expression und Reinigung von Zo1-k. **A:** Western-Blot der Testexpressionen mit und ohne IPTG-Induktion. Es wurde ein Ansatz mit 0,1 mM IPTG (+) mit einem Ansatz ohne IPTG (-) im Verlauf der Expressionsdauer (0h, 1h, 3h, ÜN) verglichen. **B:** SDS-Gel der Aufreinigung mit GSH-Sepharose und Superdex 26/60. Aufgetragen sind der Standard (L7), der Zellextrakt (A), der Durchlauf (D), die unverdauten Fraktionen der GSH-Chromatographie (1, 2), der Proteinpool nach Thrombinverdau (T), sowie die Fraktionen der Gelfiltration (3, 4, 5). Die Höhe des unverdauten Zielproteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Um ein möglichst reines Protein für Interaktionsstudien zu erhalten, wurden zahlreiche Reinigungsversuche unternommen. Dabei traten zwei Phänomene auf. Zum einen gelang es nicht, eine ausreichende Menge Protein an das Säulenmaterial zu binden, ein Großteil befand sich stets im Durchlauf. Zum anderen war die Effektivität des Thrombin-Verdau an der Säule sehr gering, so dass das Fusionsprotein vorzugsweise erst nach der Elution von der GSH-Säule einem Verdau unterzogen wurde. Dies hatte jedoch einen negativen Einfluss auf die Reinheit des Zielproteins, da so neben dem abgespaltenen GST-Tag auch unspezifisch gebundene Proteine das Eluat verunreinigten, was einen weiteren Reinigungsschritt notwendig machte. Zu diesem Zweck wurden Gelfiltrationen durchgeführt, welche jedoch auch zu keiner verbesserten Reinheit führten, aber mit einem massiven Verlust an Zielprotein einhergingen.

Um zu untersuchen, ob eine DNA-Verunreinigung die niedrige Bindungsaffinität gegenüber dem Säulenmaterial und die geringe Ausbeute beim Thrombin-Verdau

verursacht, wurde eine photometrische DNA-Bestimmung durchgeführt. Dabei betrug der Quotient aus den Extinktionen von 260 nm und 280 nm 1,96, was tatsächlich auf eine hohe Konzentration an Nukleinsäuren hindeutet. Versuche, diese Verunreinigungen durch kombinierte DNase/Rnase-Verdaus zu beseitigen, brachten nicht den gewünschten Erfolg.

Die maximal erreichbaren Ausbeuten betrugen bis zu 0,8 mg/L, was in Anbetracht der Molekülgröße von ZO1-k für NMR-spektroskopische Untersuchungen unzureichend war.

Aufgrund dieser Resultate wurde von einer Präparation im NMR-Maßstab abgesehen.

3.2.3 Interaktionsstudien von ZO-1 und AF6

Um die AF6-Bindedomäne von ZO-1 identifizieren zu können, wurden zahlreiche Interaktionsstudien durchgeführt. Dazu kamen sowohl proteinbiochemische Methoden als auch die NMR-Spektroskopie zum Einsatz.

3.2.3.1 Pulldown-Assays

Pulldown-Assays stellen eine biochemische Methode dar, die es ermöglicht, mit geringem Zeit- und Materialaufwand qualitative Aussagen über mögliche Protein-Protein-Bindungen zu erhalten. Im vorliegenden Fall sollten mit Hilfe dieser Methode diverse ZO-1-Domänen auf eine mögliche Interaktionsfähigkeit mit AF6(36-206) getestet werden. Die Konstrukte, welche hierbei zum Einsatz kamen, waren Zo1-k, P2P3, P3, und SG.

Die erste ZO-1-Domäne, die auf diese Weise auf eine Interaktion mit AF6 getestet wurde, war die N-terminale Hälfte Zo1-k. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde GST-Zo1-k mit gereinigtem AF6 untersucht, zum anderen GST-AF6 mit verdautem Zo1-k. Die Ergebnisse beider Ansätze wurden mittels SDS-PAGE sichtbar gemacht (siehe Abb. 32).

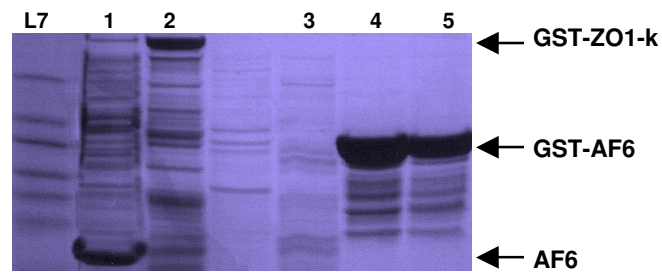


Abb. 32: Ergebnis des Pulldown-Assays von AF6(36-206) und ZO1-k, dargestellt an einem SDS-Gel. Es wurde sowohl GST-Zo1-k mit AF6 (Spuren 1 und 2), als auch GST-AF6 mit ZO1-k (Spuren 3 und 5) untersucht. Spuren 1 und 3 stellen die jeweiligen ungebundenen Überstände dar, Spuren 2 und 5 zeigen die jeweiligen Eluate. Spur 4 zeigt einen Kontrollansatz mit GST-AF6. L7: Standard.

Wie hier zu erkennen ist, binden beide GST-Fusionsproteine gut an die Glutathion-Sepharose. Der jeweilige mutmaßliche Bindungspartner ist jedoch ausschließlich in den Überständen nach der Inkubation nachweisbar, nicht im Eluat. Eine Interaktion der Proteine konnte somit auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

Die Domäne P2P3 wurde ebenfalls einem Pulldown-Assay unterzogen. Dazu wurde GST-P2P3 und gereinigtes AF6 verwendet. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, bindet GST-P2P3 an das GSH-Sepharose-Material. Nach der Inkubation mit AF6 befindet sich noch sehr viel ungebundenes Protein im Überstand. Nach dem Waschschrift ist kaum noch AF6 vorhanden. In der Elutionsfraktion ist die P2P3-Bande sehr deutlich zu erkennen, während keine AF6-Bande sichtbar ist. Nach der Inkubation mit AF6 und der Elution der Proteine konnte somit keine Bindung von GST-P2P3 und AF6 beobachtet werden.

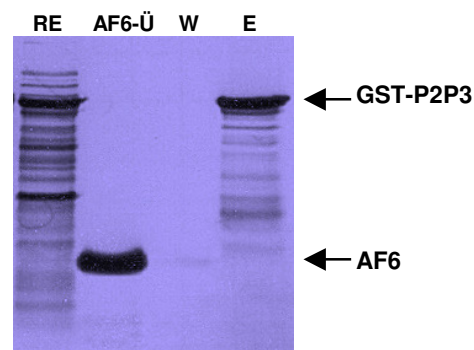


Abb. 33: Ergebnis des Pulldown-Assays von GST-P2P3 und AF6(36-206), dargestellt an einem SDS-Gel. Die erste Spur zeigt den Rohextrakt von P2P3 (RE), AF6-Ü stellt den Überstand nach Inkubation mit gereinigtem AF6 dar. Zudem sind ein Waschschrift (W) sowie das Eluat (E) aufgetragen. Pfeile markieren die beiden Proteine.

Auch die ZO-1-Domäne SG wurde einem Pull-Down-Assay unterzogen (siehe Abb. 34). Dazu wurde GST-SG an Sepharose-Beads gebunden und mit gereinigtem AF6 inkubiert. Das SDS-Gel zeigt in diesem Fall, dass sich AF6 quantitativ in ungebundener Form im Überstand nach der Inkubation befindet. In der Elutionsfraktion befindet sich lediglich GST-SG samt einiger Verunreinigungen. Somit konnte auf diese Weise auch mit der ZO-1-Domäne SG keine Interaktion mit AF6(36-206) nachgewiesen werden.

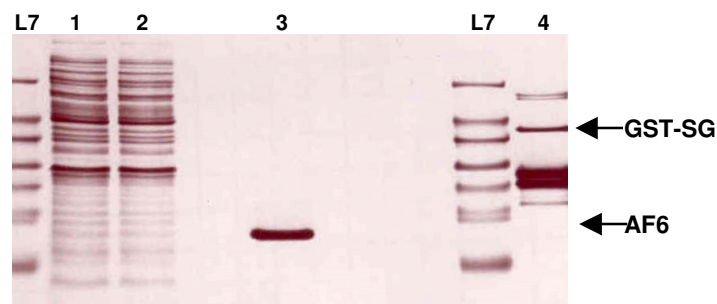


Abb. 34: SDS-Gel des Pull-down-Assays von AF6(36-206) mit GST-SG. Spuren 1 und 2 zeigen GST-SG als Rohextrakt und nach Bindung an GSH-Sepharose. In Spur 3 ist AF6 nach Inkubation mit dem gebundenen SG dargestellt. Spur 4 zeigt das Eluat. L7 stellt einen Größenmarker dar. Pfeile markieren die Höhen der genannten Proteine.

3.2.3.2 Crosslink-Assays

3.2.3.2.1 Protein-DNA-Crosslink

Bei der Reinigung der ZO-1-Domäne SG traten starke DNA-Verunreinigungen auf, welche selbst mit dem Einsatz von Nukleasen nicht beseitigt werden konnten. Um die Möglichkeit einer Protein-DNA-Interaktion zu untersuchen, wurde ein Crosslink-Assay mittels Formaldehyd durchgeführt. Das Ergebnis dieses Tests wurde anhand eines silber gefärbten SDS-Gels ausgewertet, da mit dieser Färbemethode DNA in Form eines gelben Hintergrundes sichtbar gemacht werden kann.

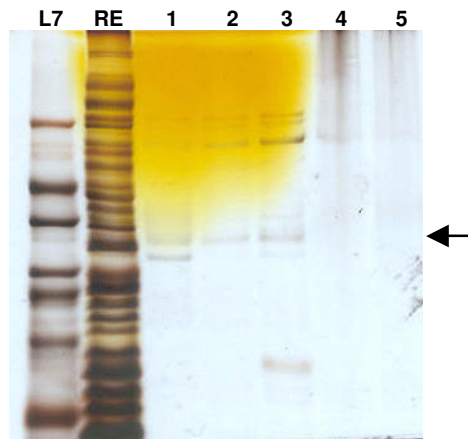


Abb. 35: Ergebnisse des Crosslinkings mit Formaldehyd, dargestellt anhand eines silbergefärbten SDS-Gels. Aufgetragen sind der Rohextrakt (RE) sowie Aliquots von gereinigtem SG mit DNase-Verdau (1), Rnase-Verdau (2), kombiniertem Nukleaseverdau (3) sowie zwei Crosslinking-Ansätze ohne (4) und mit (5) Nukleaseverdau. Die Höhe der SG-Bande ist mit einem Pfeil markiert. Nukleinsäuren erscheinen gelb. L7: Größenmarker.

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, weisen die Spuren 1 bis 3 deutliche DNA-Verunreinigungen auf. Die Behandlung mit DNase oder RNase verursacht dabei keine Veränderung dieses DNA-Musters. Die Spuren 4 und 5 zeigen die Resultate des Formaldehyd-Crosslinks. Man sieht eine deutliche Retardation der Proteinbanden, welche an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel verbleiben. DNA-Spuren können nicht mehr nachgewiesen werden.

3.2.3.2.2 Protein-Protein-Crosslink

Um zu untersuchen, ob die Ergebnisse der Pulldown-Assays mit einer erhöhten Dissoziation der Proteine erklärt werden können, wurden sogenannte Protein-Protein-Crosslinks durchgeführt, da die Ausbildung einer solchen kovalenten Verbindung zwischen zwei Proteinen die unmittelbare Nähe dieser Moleküle zueinander beweisen würde. Als Linker-Molekül wurde dazu Glutaraldehyd ausgewählt, ein homo-bifunktionales Reagens, das spezifisch mit primären Aminogruppen reagiert, wie sie zu Beispiel in Lysinresten vorkommen.

Zur Durchführung der Versuche wurde AF6(36-206) mit aufsteigenden Konzentrationen des mutmaßlichen Bindepartners titriert und mit 0,0035% Glutaraldehyd versetzt. Die Ergebnisse wurden durch SDS-PAGE sichtbar gemacht.

Zunächst wurde ZO1-k auf eine Interaktion mit AF6(36-206) untersucht. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten bei der Präparation wurde dazu das GST-Fusionsprotein von ZO1-k eingesetzt.

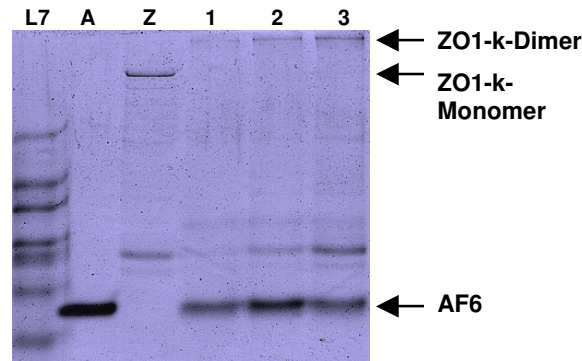


Abb. 36: SDS-PAGE des Crosslinkings mit Glutaraldehyd von AF6(36-206) und ZO1-k. Aufgetragen sind die gereinigten Proteine AF6 (A), ZO1-k (Z) sowie drei Ansätze mit AF6 und steigenden Konzentrationen von ZO1-k (1, 2, 3), versetzt mit 0,0035% Glutaraldehyd. Pfeile markieren die Höhe des ZO1-k-Dimers, des ZO1-k-Monomers sowie von AF6. L7: Standard.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, verschwindet die GST-ZO1-k Bande in allen drei Ansätzen, während die Verunreinigung bei 29 kDa bei steigender Konzentration erwartungsgemäß zunimmt. Dazu taucht eine neue Bande weit oberhalb der Höhe von GST-ZO1-k auf, welche ebenfalls im Laufe der Konzentrationserhöhungen an Stärke zunimmt. Die AF6 Bande bleibt dagegen unverändert, eine zu erwartende Abnahme kann nicht beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der neuen Bande nicht um eine Verbindung aus ZO-1-k und AF6, sondern um ein ZO1-k Homodimer handelt.

Die ZO-1 Domäne P2P3 wurde ebenfalls einem Crosslink-Assay unterzogen. Die Versuchsparmeter blieben dabei unverändert.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 37 dargestellt. Wie beim vorangegangenen Experiment bleibt auch hier die AF6 Bande unverändert. P2P3, welches in steigenden Konzentrationen zugegeben wurde, zeigt sich in einer Bande, welche in seiner Intensität zunimmt. Oberhalb von 66 kDa kommt eine weitere, schwache Bande zum Vorschein, welche keinem der beiden Kontrollansätze zugeordnet werden kann.

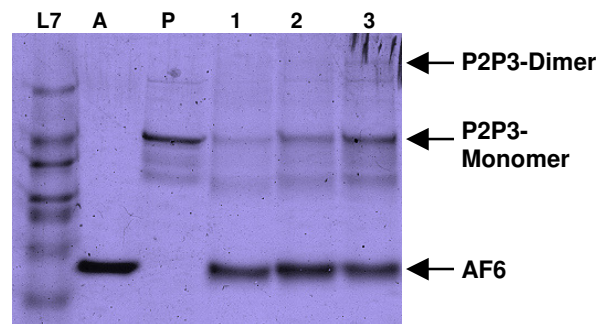


Abb. 37: SDS-PAGE des Crosslinkings mit Glutaraldehyd von AF6(36-206) und P2P3. Aufgetragen sind die gereinigten Proteine AF6 (A), P2P3 (Z) sowie drei Ansätze mit AF6 und steigenden Konzentrationen von P2P3 (1, 2, 3), versetzt mit 0,0035% Glutaraldehyd. Pfeile markieren die Höhe des P2P3-Dimers, des P2P3-Monomers sowie von AF6. L7: Standard.

3.2.3.3 Analytische Gelfiltrationen

Eine weitere Methode, Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen, ist die analytische Größenausschlusschromatographie. Dazu wurden AF6 und ZO-1 in äquimolaren Mengen zusammengeführt und auf eine Superdex 10/30 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Fraktionen wurden anhand einer SDS-PAGE in Kombination mit dem Säulenchromatogramm ausgewertet.

Zunächst wurde die Bindung von AF6(36-206) an die ZO-1 Domäne P3 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

Das Chromatogramm des Säulenlaufs zeigt drei Signale, die im relevanten Auftrennungsbereich liegen. Die Auswertung zeigte, dass die ersten beiden Signale durch Kontaminanten verursacht wurden. Dem dritten Peak konnten zwei Proteinbanden zugeordnet werden, welche als AF6 und P3 identifiziert wurden. Eine Interpretation dieses Ergebnisses erfordert allerdings die Berücksichtigung der Tatsache, dass beide Proteine eine ähnliche molekulare Masse aufweisen.

Ebenso wurden die Proteine AF6(1-141) und ZO-1-P2⁺ anhand dieser Methode auf eine Interaktion untersucht. Auch hier zeigt das Chromatogramm diverse Signale, welche anhand einer Gelelektrophorese ausgewertet wurden (siehe Abb. 39). Demnach bestand der erste Peak aus Kontaminanten, während im zweiten Peak überwiegend P2⁺ zu finden war und ferner eine Bande, welche AF6 zugeordnet werden konnte. Der größte Anteil an AF6 befand sich im dritten Signal, welches mit dem zweiten zum Teil Überschneidungen aufweist.

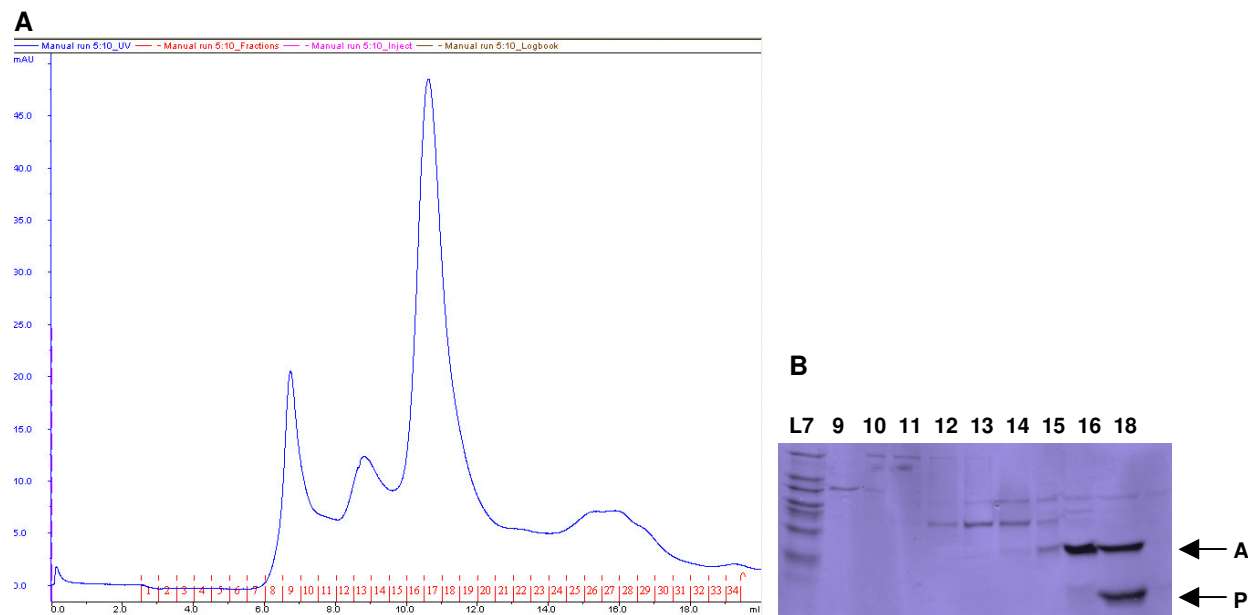


Abb. 38: Ergebnis der Analytischen Gelfiltration von AF6(36-206) und P3. **A:** Dargestellt ist das Chromatogramm des Säulenlaufs, gemessen als UV-Absorption in relativen Einheiten. **B:** SDS-PAGE der Fraktionen 9 bis 18 zur Analyse der Proteinzusammensetzung. Pfeile markieren die Proteine AF6 (A) und P3 (P).

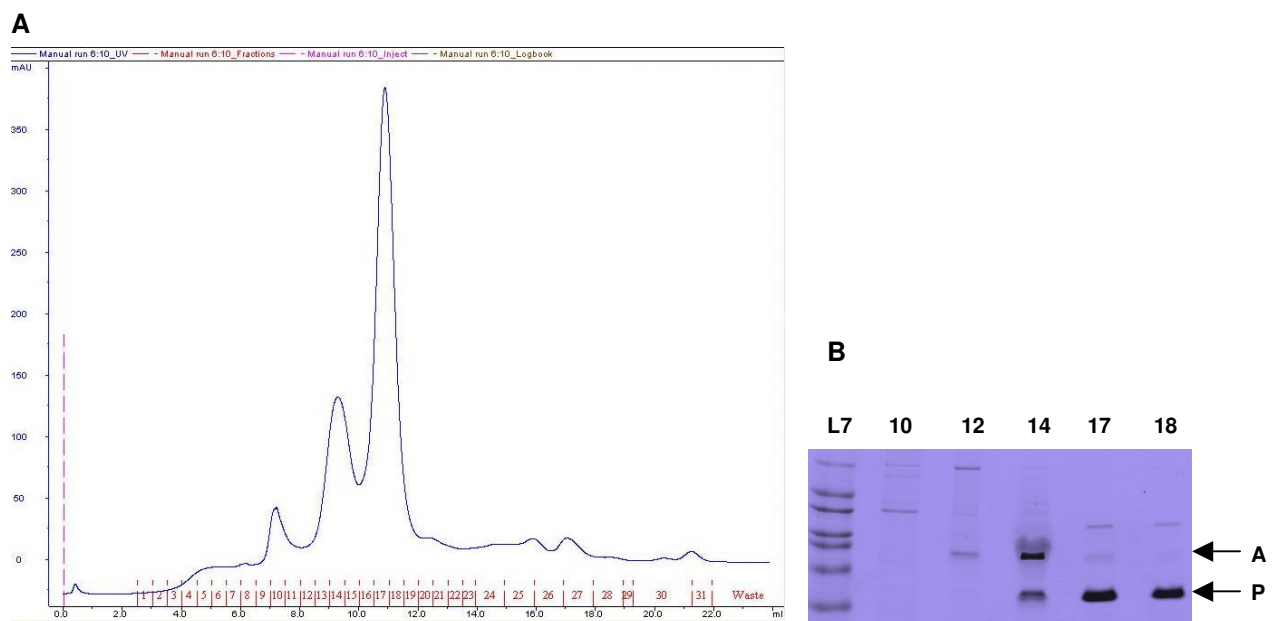


Abb. 39: Ergebnis der Analytischen Gelfiltration von AF6(36-206) und P2⁺. **A:** Dargestellt ist das Chromatogramm des Säulenlaufs, gemessen als UV-Absorption in relativen Einheiten. **B:** SDS-PAGE der Fraktionen 9 bis 18 zur Analyse der Proteinzusammensetzung. Pfeile markieren die Proteine AF6 (A) und P2⁺ (P).

3.2.3.4 Fluoreszenz-Titration

Die Tatsache, dass die Domäne AF6(1-141) über zwei Tryptophane verfügt, welche als intrinsische Fluorophore dienen können, ermöglichte den Versuch einer Fluoreszenz-Titration. Hierzu wurde ein Titrationspartner benötigt, welcher zum Ausschluss falsch positiver Effekte kein Tryptophan besitzen durfte. Das ZO-1 Konstrukt P2P3 erfüllte diese Voraussetzung.

Zu Beginn der Messungen lag AF6 in einer Konzentration von 4 μM vor, während P2P3 eine Konzentration von 50 μM aufwies. Im Verlauf des Versuchs wurde P2P3 in steigenden Konzentrationen zu AF6 titriert, wobei nach jeder Titrationsstufe eine Messung durchgeführt wurde. Die Anregungswellenlänge betrug 290 nm und das gemessene Emissionsspektrum reichte von 300 nm bis 500 nm. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 40 dargestellt.

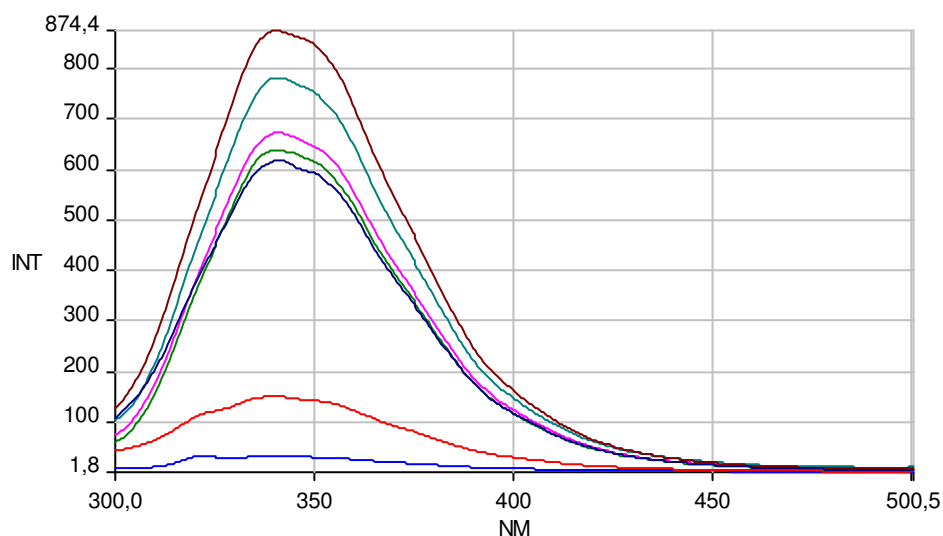


Abb. 40: Ergebnisse der Fluoreszenztitration von AF6(1-141) mit Zo1-P2P3. Dargestellt sind die Spektren aller Titrationsstufen sowie des Puffers, aufgetragen als Intensität der Emission in relativen Einheiten (INT) gegen die Wellenlänge in nm (NM). Das Spektrum des Puffers ist in blau, das von P2P3 in rot dargestellt. Die Spektren der jeweiligen Titrationsstufen sind in grün (1:0), pink (1:0,5), türkis (1:1), braun (1:2) und dunkelblau (0,5:2,5) dargestellt.

Zur Auswertung der Spektren wurde das jeweilige Intensitätsmaximum in relativen Einheiten bei 340 nm bestimmt. Die Titrationsstufen sowie die zugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Zunächst wurde die Emission des Puffers gemessen, welche eine Intensität von 32,5 Einheiten aufwies. Das Emissionsspektrum des Titrationspartners P2P3 hatte ein Maximum von 151 Einheiten, welches abzüglich des Puffer-Wertes zur Berechnung der theoretischen Summe der Intensitäten herangezogen wurde. Der Vergleich der gemessenen Intensitäten mit den theoretisch berechneten ergab, gerade bei den höheren Titrationsstufen, keine signifikante Abweichung. Eine Interaktion von AF6(1-141) und ZO-1-P2P3 konnte mit dieser Methode somit nicht beobachtet werden.

Verhältnis AF6 : P2P3	Emissionsmaximum (gemessen)	Emissionsmaximum (berechnet)	Differenz
0 : 1	151		
1 : 0	638		
1 : 0,5	672	697	25
1 : 1	781	757	-24
1 : 2	874	875	1
0,5 : 2,5	616	615	-1

Tab. 2: Ergebnisse der Fluoreszenztitration von AF6(1-141) mit ZO-1-P2P3. Dargestellt sind die Titrationsstufen als Konzentrationsverhältnisse der beteiligten Proteine zueinander. Die Differenzen aus gemessenen und berechneten Emissionsmaxima vergleichen die tatsächlichen Messwerte mit den theoretischen Werten für nicht interagierende Proteine.

3.2.3.5 NMR-Experimente

Da die Resultate der biochemischen Interaktionsexperimente keine eindeutigen Interpretationen hinsichtlich des Bindungscharakters zwischen AF6 und ZO-1 zuließen, wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt, um eine möglicherweise schwache Interaktion dieser beiden Proteine nachweisen zu können. Zu diesem Zweck wurden Trosy-HSQC-Messungen eines ^{15}N -markierten Proteins durchgeführt, welches sukzessive mit einem unmarkierten potentiellen Bindungspartner titriert wurde, wobei nach jedem Titrationsschritt ein Spektrum aufgenommen wurde. Das Ergebnis war jeweils eine Reihe von Spektren, welche Signale enthielten, die den Aminosäuren des markierten Proteins zuzuordnen sind. Um Artefakte, welche auf Veränderungen im pH-Wert oder Salzgehalt zurückzuführen wären, auszuschließen, mussten beide Proteine im identischen Puffer vorliegen. Außerdem waren hohe Konzentrationen der beteiligten Proteinlösungen erforderlich, um einem zu starken Verdünnungseffekt der beteiligten Komponenten im Laufe des Experiments entgegenzuwirken. Zur Auswertung dieser Titrationsexperimente wurden die einzelnen Spektren mit Hilfe des Programms AUREMOL miteinander verglichen. Kam es im Laufe der Titration zu lokalen Verschiebungen einzelner Signale, wurde dies mit einer Änderung der chemischen Umgebung der entsprechenden Aminosäure in Verbindung gebracht, welche durch eine Interaktion mit dem zugegebenen Protein zustande kommt.

Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente untereinander zu gewährleisten, blieben sämtliche Parameter der Messungen identisch. Lediglich die Pulslängen und die Anzahl der Scans wurden den jeweiligen Gegebenheiten angepasst. Alle Messungen wurden bei 600 MHz und 293 K durchgeführt. Der pH-Wert der Proteinproben lag konstant bei 6,9.

3.2.3.5.1 Titrationsexperimente

(a) ^{15}N -SH3-I + AF6(36-206)

Das erste Titrationsexperiment wurde mit der ZO-1 Domäne SH3-I durchgeführt. Dazu wurden TROSY-Messungen angewandt, mit deren Hilfe sowohl der Faltungszustand des Proteins, als auch sein AF6-Bindungsvermögen beurteilt werden konnten. Abbildung 41 zeigt das Spektrum von ^{15}N -SH3-I.

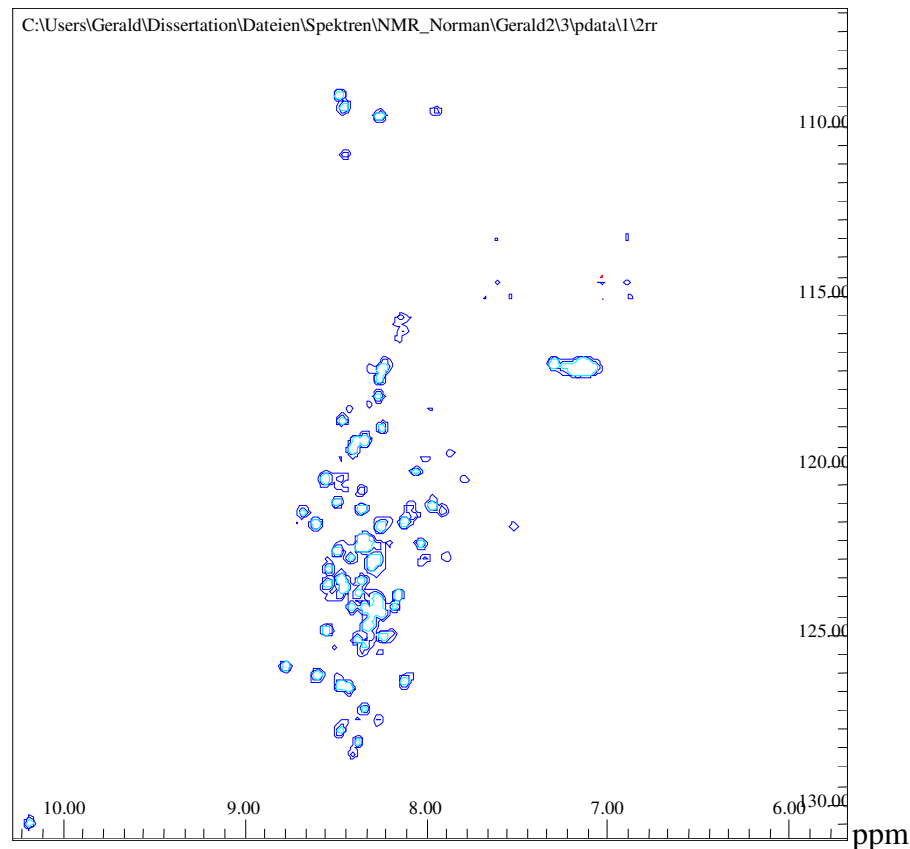


Abb. 41: ^{15}N -Trosy-HSQC Spektrum von renaturiertem Zo1-SH3-I in 100 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5), gemessen bei 600 Hz. Für die Messung wurden 256 Scans bei 293 K durchgeführt.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, weisen die Signale des Proteins eine geringe Dispersion auf, was entweder auf eine schlechte Proteinfaltung oder auf eine Aggregation der SH3-I Domäne hindeutet. Die anschließende Titration mit AF6(36-206) ergab keine Änderungen der chemischen Verschiebungen (Ergebnis nicht gezeigt). Dies ist mit einer fehlenden Interaktion der beiden Proteine gleichzusetzen. Da es sich hierbei um ein synthetisch renaturiertes Protein handelte, das somit keinen Anspruch auf eine native Faltung erheben kann, wurde die Untersuchung dieser Proteindomäne zugunsten der Analyse löslich exprimierbarer Konstrukte zunächst nicht weiter verfolgt.

(b) ^{15}N -AF6(1-141) + P2P3

Auch die P2P3-Domäne von ZO-1 wurde einer ^{15}N -Trosy-Messung unterzogen. Allerdings wurde hier die AF6-Komponente der Titration markiert, die P2P3-Domäne

wurde unmarkiert zugegeben. Die Konzentration von AF6(1-141) betrug zu Beginn der Messung 250 μM , die Konzentration von P2P3 285 μM . Tabelle 3 zeigt die Stufen der Titration. Alle Messungen wurden bei 293 K durchgeführt.

Verhältnis	AF6 [μl]	P2P3 [μl]
1 : 0	500	0
1 : 0,5	500	219
1 : 1	500	438
1 : 1,5	500	657

Tab. 3: Dargestellt sind die Stufen der Titrationsmessung von ^{15}N -AF6(1-141) mit P2P3 als molares Verhältnis der Proteine und die dazu eingesetzten Volumina.

Im Laufe der Messungen konnte eine progressive Trübung der Proteinlösung beobachtet werden, die auf eine Präzipitation von AF6 zurückzuführen war. Dies hatte eine Verringerung der Konzentration an löslichem Protein zur Folge, was sich sowohl auf die Qualität der Messungen, als auch auf das Verhältnis von AF6 zu P2P3 auswirkte. Da jedoch hauptsächlich eine qualitative Aussage über eine mutmaßliche Proteininteraktion im Vordergrund stand, wurden die Messungen fortgesetzt.

Das TROSY-Spektrum von ^{15}N -AF6(1-141) zeigt eine breite Dispersion und eine hohe Auflösung der Signale, was auf einen guten Faltungszustand des Proteins hindeutet. Die Zugabe der ZO-1-Domäne P2P3 bewirkt zum Teil deutliche Änderungen einzelner Signale des Spektrums. Abbildung 42 zeigt zwei Spektren von AF6, wobei das grüne Spektrum den Zustand vor der Zugabe der Titrationspartners zeigt, wohingegen das rote Spektrum den Zustand von AF6 nach Zugabe der ZO-1 Domäne bei einem Verhältnis von 1 : 1 darstellt.

Eine Titration von AF6(36-206) mit P2P3 zeigte ebenfalls deutliche Signaländerungen, die jenen der Domäne AF6(1-141) entsprachen.

Da von der Domäne AF6(1-141) bereits eine Zuordnung der Signale existierte, war es möglich, mit Hilfe des Programms AUREMOLTM jene Aminosäuren von AF6 zu identifizieren, welche an der Interaktion mit ZO-1 direkt beteiligt sind.

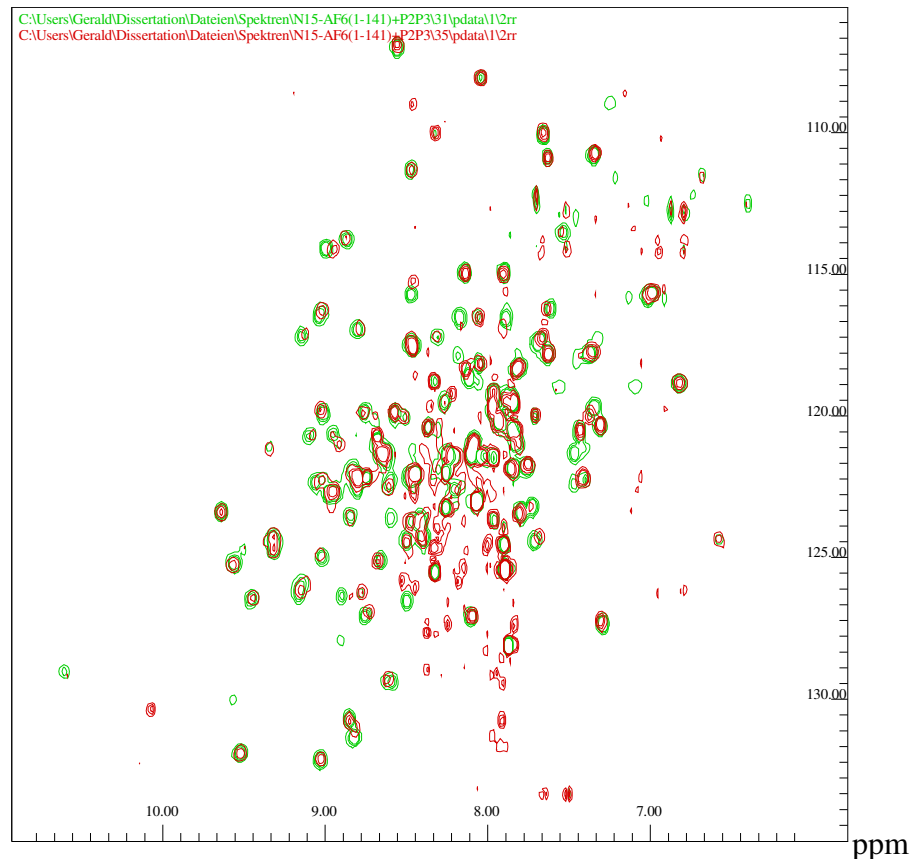


Abb. 42: Abbildung der ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren der Titration von ^{15}N -markiertem AF6(1-141) mit P2P3 im molaren Verhältnis 1 : 1. Das Spektrum von AF6 vor Zugabe des potentiellen Bindungspartners ist grün, jenes nach Zugabe von P2P3 rot dargestellt. Beide Proteine lagen in 10 mM Na-Phosphat (pH 6,9) mit 100 mM NaCl und 1 mM DTT vor. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei 293 K aufgenommen.

(c) ^{15}N -AF6(36-206) + P3

Mit dem Ziel, die AF6-Bindedomäne von ZO-1 weiter einzugrenzen, wurde eine Titration von ^{15}N -markiertem AF6 mit dem Konstrukt P3 durchgeführt. Die Titrationsstufen wurden wie in Tab 4 dargestellt gewählt, wobei auch hier die Präzipitation von AF6 die genauen Proteinkonzentrationen verfälschte. Diese betrugen zu Beginn bei AF6 250 μM und bei der ZO-1-Domäne 840 μM .

Das ^{15}N -HSQC-Spektrum von AF6(36-206) vor der Titration war mit dem der vorhergehenden Messreihe weitgehend identisch. Die Auswertung des Experiments ergab im Gegensatz zur Titration mit der P2P3-Domäne hier keine signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungen (siehe Abb 43). Signale, welche im Titrationsspektrum scheinbar verschwinden, werden bei entsprechender

Vergrößerung sichtbar. Das Ergebnis dieses Versuchs macht somit eine Interaktion der ZO-1 Domäne P3 mit AF6 äußerst unwahrscheinlich.

Verhältnis	AF6 [μ l]	P3 [μ l]
1 : 0	500	0
1 : 0,5	500	75
1 : 1,5	500	225
1 : 3	500	450

Tab. 4: Dargestellt sind die Stufen der Titrationsmessung von ^{15}N -AF6(36-206) mit P3 als molares Verhältnis der Proteine und die dazu eingesetzten Volumina.

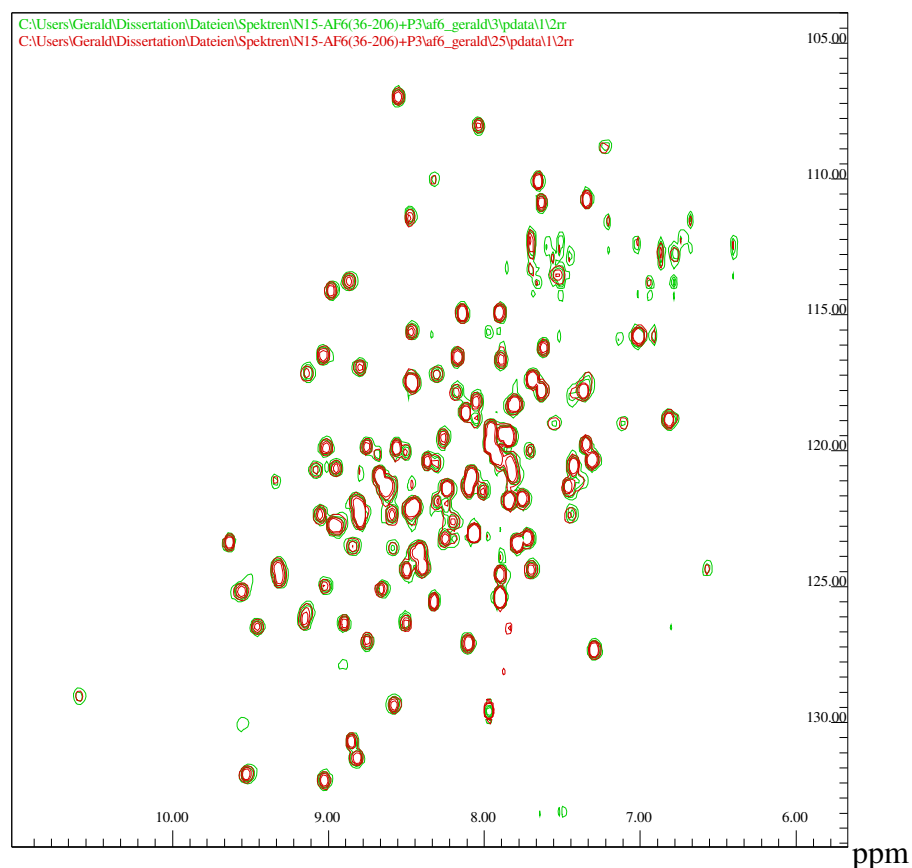


Abb. 43: Abbildung der ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren der Titration von ^{15}N -markiertem AF6(36-206) mit P3 im molaren Verhältnis 1 : 3. Das Spektrum von AF6 vor Zugabe des potentiellen Bindungspartners ist grün, jenes nach Zugabe von P3 rot dargestellt. Beide Proteine lagen in 10 mM Na-Phosphat (pH 6,9) mit 100 mM NaCl und 1 mM DTT vor. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei 293 K aufgenommen.

(d) ^{15}N -AF6 (1-141) + P2⁺

Um die AF6-Bindedomäne von ZO-1 weiter einzugrenzen, wurde eine Titration von AF6(1-141) mit der Domäne P2⁺ durchgeführt. Auch hier wurde die AF6-Domäne ^{15}N -markiert eingesetzt, während P2⁺ unmarkiert zugegeben wurde. Die Konzentrationen betrugen 250 μM (AF6) und 1,8 mM (P2⁺). Die Messparameter entsprachen dabei den vorhergehenden Experimenten. In Tab. 5 sind die Titrationsstufen der Messreihe dargestellt.

Auch in diesem Fall ließ sich wieder eine progressive Trübung der Proteinlösung beobachten, was dazu führte, dass die letzte Titrationsstufe, welche einem molaren Verhältnis von 1 : 2 entsprach, zu einer Auswertung nicht herangezogen werden konnte.

Verhältnis	AF6 [μl]	P2 ⁺ [μl]
1 : 0	500	0
1 : 0,5	500	35
1 : 1	500	70
1 : 1,5	500	105
1 : 2	500	139

Tab. 5: Dargestellt sind die Stufen der Titrationsmessung von ^{15}N -AF6(1-141) mit P2⁺ als molares Verhältnis der Proteine und die dazu eingesetzten Volumina.

Ein Vergleich der übrigen Spektren ließ deutliche Veränderungen der Signale im Laufe der Titration erkennen. Dies lässt auf eine Interaktion von AF6(1-141) und der P2⁺-Domäne von ZO-1 schließen. In Abbildung 44 sind die Spektren der ersten und vierten Titrationsstufe übereinandergelegt.

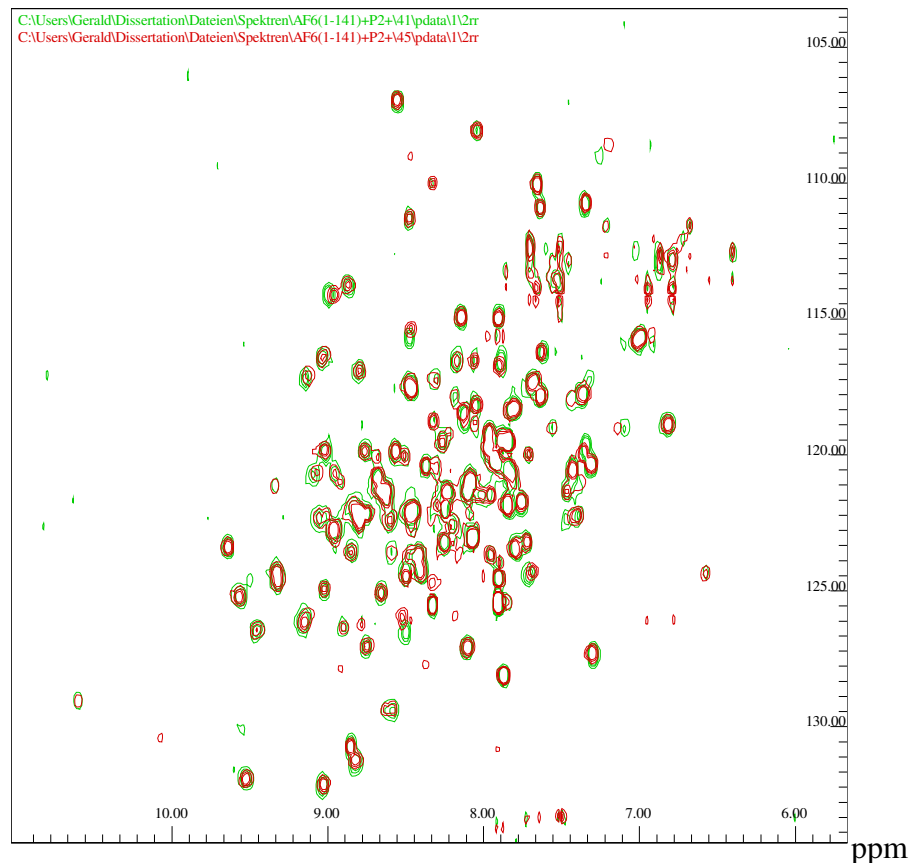
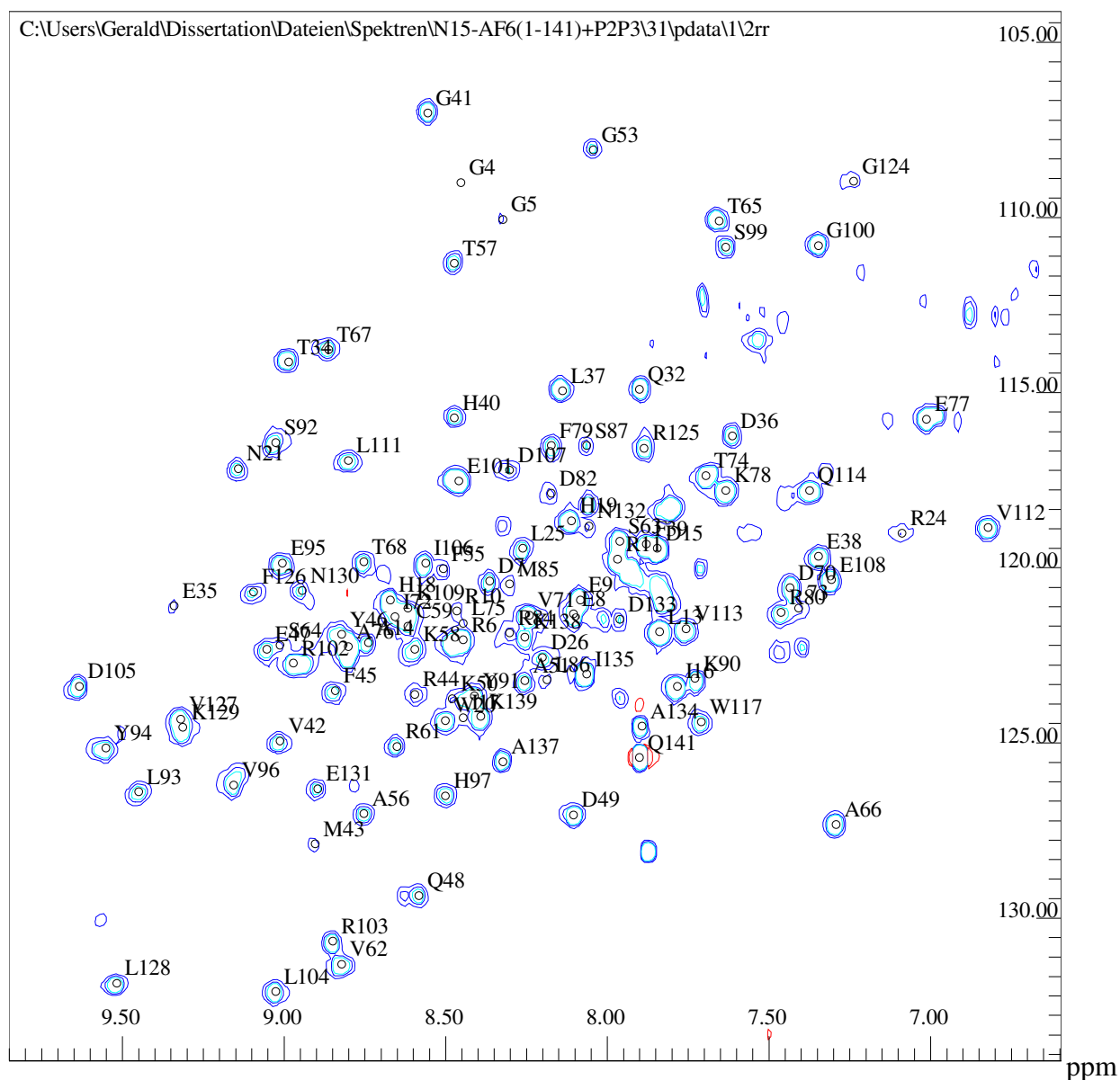


Abb. 44: Abbildung der ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren der Titration von ^{15}N -markiertem AF6(1-141) mit P2^+ im molaren Verhältnis 1 : 1. Das Spektrum von AF6 vor Zugabe des potentiellen Bindungspartners ist grün, jenes nach Zugabe von P2^+ rot dargestellt. Beide Proteine lagen in 10 mM Na-Phosphat (pH 6,9) mit 100 mM NaCl und 1 mM DTT vor. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei 293 K aufgenommen.

3.2.3.5.2. Auswertung der NMR-Daten

Auf Basis der experimentell ermittelten NMR-Daten wurde nun anhand diverser computergestützter Programme ein Bindungsmodell von AF6 erzeugt. Dazu mussten zunächst die aus den Titrationsreihen erhaltenen TROSY-Spektren in das Programm AUREMOL eingelesen und eine Zuordnung der Signale vorgenommen werden. Da für die Ras-Bindedomäne AF6(1-141) bereits eine, wenn auch lückenhafte, sequenzielle Zuordnung eines ^{15}N -TROSY-Spektrums existierte, konnte diese automatisch auf die aktuellen Spektren übertragen werden. Artefakte wurden durch eine manuelle Überprüfung der Signale eliminiert. Auf diese Weise konnten 78% der Aminosäuren eindeutig zugeordnet werden. Abbildung 45 zeigt das zugeordnete Spektrum von AF6(1-141), welches nun als Referenz diente.



Basierend auf diesem Referenzspektrum wurden anschließend die Verschiebungen der Signale nach Zugabe der ZO-1 Domäne P2⁺ ermittelt. Als Vergleichsspektrum wurde das der dritten Titrationsstufe verwendet, welches einen Kompromiss aus hoher Signalauflösung und signifikanter Signalverschiebungen darstellte. Die Berechnung der Signalveränderungen wurde automatisch mit dem Programm AUREMOL durchgeführt [Schumann et al., 2007]. Die Resultate sind in Abbildung 46 graphisch dargestellt.

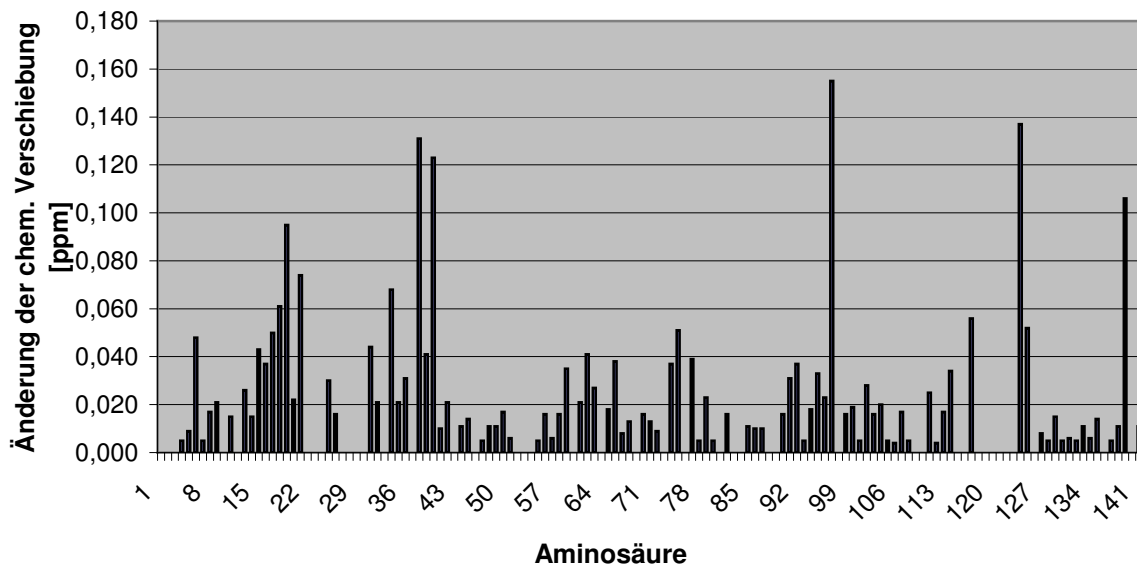
AF6 und P2⁺, Verhältnis 1:1

Abb 46: Änderungen der chemischen Verschiebungen sämtlicher Residuen von AF6(1-141) bei Zugabe der P2⁺-Domäne von ZO-1 im Verhältnis 1:1. Aufgetragen sind die mit AUREMOL berechneten Signaldifferenzen in ppm gegen die Aminosäuresequenz von AF6(1-141).

Zwei Bereiche weisen dabei besonders deutliche Signalverschiebungen auf, Leu13 bis Asn21 und Ser31 bis His40. Außerhalb dieser Bereiche lassen sich drei weitere Signale identifizieren, die ebenfalls eine starke Änderung erfahren, nämlich His97, Gly124 und Lys139.

Zur besseren Einschätzung der Abhängigkeit der Verschiebungsänderung vom Verhältnis der beiden Interaktionspartner wurde in Abbildung 47 die Änderung der chemischen Verschiebung gegen das Verhältnis von AF6 und P2⁺ aufgetragen. Dazu wurden stellvertretend für alle stark wechselwirkenden Reste die Aminosäuren His19, Glu38 und His97 ausgewählt. Dabei ist zu beobachten, dass bei einem molaren Verhältnis der Komponenten von 1 : 1,5 noch keine Sättigung eintritt. Eine Bestimmung der Bindungskonstante konnte somit noch nicht vorgenommen werden.

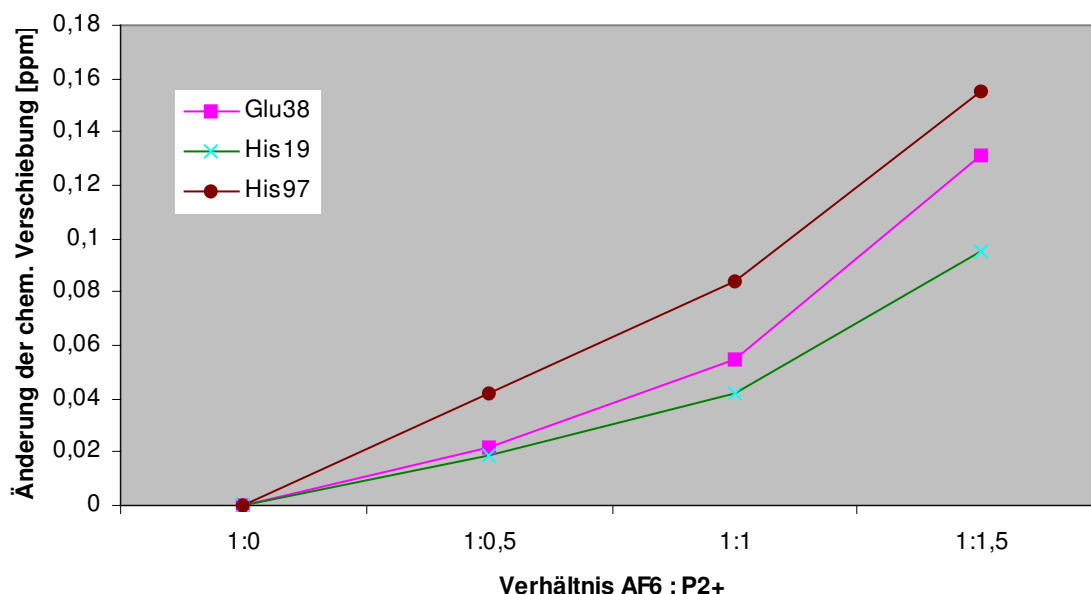


Abb. 47: Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Verhältnis der Interaktionspartner AF6(1-141) und ZO1-P2⁺.

Basierend auf den Resultaten der Titrationsmessungen konnten nun diejenigen Reste von AF6 identifiziert werden, die an der Wechselwirkung mit ZO-1 direkt beteiligt sind. Dazu wurden zunächst jene Aminosäuren selektiert, die gemäß der Interaktionsvorhersage mittels AUREMOL eine Signaländerung von mindestens 0,25 aufwiesen und somit als signifikant eingestuft wurden. Dabei muss allerdings die Tatsache berücksichtigt werden, dass diese Änderungen sowohl auf eine direkte Interaktion mit der Oberfläche von ZO-1 als auch auf konformationelle Änderungen des Proteins zurückgeführt werden können.

Zur strukturellen Lokalisation der Aminosäuren mit den deutlichsten Signalverschiebungen und zur Identifizierung einer möglichen Interaktionsfläche auf der Oberfläche des Proteins wurde mittels MOLMOL ein Strukturmodell von AF6(1-141) erstellt, welches auf bereits existierenden Strukturdaten beruht. Mit Hilfe dieses Programms wurde dabei zunächst eine Berechnung der prozentualen Oberflächenexposition der einzelnen Residuen durchgeführt, um ihre Beteiligung an der Interaktion besser abschätzen zu können. In Tabelle 6 sind sowohl die Signalverschiebungen als auch die Oberflächenzugänglichkeit jeder einzelnen Aminosäure von AF6(1-141) aufgelistet.

Aminosäure		Signal- änderung [ppm]	signifikant	Oberflächen- exposition [%]
1	MET	0,000	no	65.0
2	SER	0,000	no	46.9
3	ALA	0,000	no	35.1
4	GLY	0,005	no	26.8
5	GLY	0,009	no	16.0
6	ARG	0,048	yes	53.3
7	ASP	0,005	no	30.7
8	GLU	0,017	no	15.4
9	GLU	0,021	no	19.3
10	ARG	0,000	no	19.2
11	ARG	0,015	no	47.5
12	LYS	0,000	no	38.4
13	LEU	0,026	yes	1.5
14	ALA	0,015	no	7.6
15	ASP	0,043	yes	31.5
16	ILE	0,037	yes	18.2
17	ILE	0,050	yes	0.8
18	HIS	0,061	yes	38.9
19	HIS	0,095	yes	48.7
20	TRP	0,022	no	26.1
21	ASN	0,074	yes	0.0
22	ALA	0,000	no	26.1
23	ASN	0,000	no	54.7
24	ARG	0,000	no	28.9
25	LEU	0,030	yes	0.9
26	ASP	0,016	no	8.8
27	LEU	0,000	no	0.0
28	PHE	0,000	no	39.4
29	GLU	0,000	no	31.9
30	ILE	0,000	no	7.3
31	SER	0,044	yes	19.0
32	GLN	0,021	no	14.6
33	PRO	0,000	no	11.4
34	THR	0,068	yes	30.1
35	GLU	0,021	no	53.9
36	ASP	0,031	yes	20.7
37	LEU	0,000	no	25.0
38	GLU	0,131	yes	0.5
39	PHE	0,041	yes	17.2

40	HIS	0,123	yes	3.6
41	GLY	0,010	no	1.5
42	VAL	0,021	no	17.4
43	MET	0,000	no	0.2
44	ARG	0,011	no	35.5
45	PHE	0,014	no	0.0
46	TYR	0,000	no	17.2
47	PHE	0,005	no	2.3
48	GLN	0,011	no	23.6
49	ASP	0,011	no	10.5
50	LYS	0,017	no	43.2
51	ALA	0,006	no	44.2
52	ALA	0,000	no	38.6
53	GLY	0,000	no	30.8
54	ASN	0,000	no	29.2
55	PHE	0,005	no	46.3
56	ALA	0,016	no	10.6
57	THR	0,006	no	26.5
58	LYS	0,016	no	5.1
59	CYS	0,035	yes	30.3
60	ILE	0,000	no	0.0
61	ARG	0,021	no	19.7
62	VAL	0,041	yes	0.0
63	SER	0,027	yes	0.0
64	SER	0,000	no	1.8
65	THR	0,018	no	20.7
66	ALA	0,038	yes	0.0
67	THR	0,008	no	4.9
68	THR	0,013	no	0.0
69	GLN	0,000	no	24.2
70	ASP	0,016	no	11.2
71	VAL	0,013	no	0.0
72	ILE	0,009	no	0.1
73	GLU	0,000	no	32.0
74	THR	0,037	yes	5.8
75	LEU	0,051	yes	0.0
76	ALA	0,000	no	1.8
77	GLU	0,039	yes	34.0
78	LYS	0,005	no	26.3
79	PHE	0,023	no	31.0
80	ARG	0,005	no	34.9

81	PRO	0,000	no	14.5
82	ASP	0,016	no	13.5
83	MET	0,000	no	59.2
84	ARG	0,000	no	60.1
85	MET	0,011	no	26.5
86	LEU	0,010	no	15.1
87	SER	0,010	no	12.2
88	SER	0,000	no	45.3
89	PRO	0,000	no	25.7
90	LYS	0,016	no	26.0
91	TYR	0,031	yes	19.3
92	SER	0,037	yes	0.0
93	LEU	0,005	no	0.0
94	TYR	0,018	no	18.9
95	GLU	0,033	yes	4.1
96	VAL	0,023	no	2.7
97	HIS	0,155	yes	7.2
98	VAL	0,000	no	32.4
99	SER	0,016	no	39.0
100	GLY	0,019	no	6.9
101	GLU	0,005	no	40.2
102	ARG	0,028	yes	21.8
103	ARG	0,016	no	45.5
104	LEU	0,020	no	13.5
105	ASP	0,005	no	8.0
106	ILE	0,004	no	8.9
107	ASP	0,017	no	36.4
108	GLU	0,005	no	11.7
109	LYS	0,000	no	11.5
110	PRO	0,000	no	1.1
111	LEU	0,025	no	0.0
112	VAL	0,004	no	5.7
113	VAL	0,017	no	5.9
114	GLN	0,034	yes	9.7
115	LEU	0,000	no	27.8
116	ASN	0,000	no	33.8
117	TRP	0,056	yes	48.1
118	ASN	0,000	no	21.8
119	LYS	0,000	no	20.2
120	ASP	0,000	no	45.4
121	ASP	0,000	no	28.9

122	ARG	0,000	no	37.4
123	GLU	0,000	no	20.2
124	GLY	0,137	yes	4.3
125	ARG	0,052	yes	15.0
126	PHE	0,000	no	1.4
127	VAL	0,008	no	1.0
128	LEU	0,005	no	2.9
129	LYS	0,015	no	11.9
130	ASN	0,005	no	9.5
131	GLU	0,006	no	24.9
132	ASN	0,005	no	32.8
133	ASP	0,011	no	10.7
134	ALA	0,006	no	20.6
135	ILE	0,014	no	30.6
136	PRO	0,000	no	47.7
137	ALA	0,005	no	32.4
138	LYS	0,011	no	47.2
139	LYS	0,106	yes	68.6
140	ALA	0,000	no	33.4
141	GLN	0,011	no	55.2

Tab. 6: Die Tabelle zeigt die Beträge der Signaländerungen sowie deren Signifikanz für die Komplexbildung (berechnet mit AUREMOL). In der rechten Spalte ist die prozentuale Oberflächenexposition der jeweiligen Aminosäure dargestellt (berechnet mit MOLMOL). Grundlage bilden die Resultate der Titrationsmessung von AF6(1-141) und ZO1-P2*.

Um als Teil einer Kontaktfläche zwischen den beiden Interaktionspartnern in Frage zu kommen, mussten die Residuen neben der signifikanten Signaländerung eine hohe Oberflächenexposition aufweisen. Der Schwellenwert wurde hierzu auf 20% festgelegt. Das Ergebnis dieser Selektion waren die Aminosäuren Arg6, Asp15, His18, His19, Thr34, Asp36, Cys59, Glu77, Arg102, Trp117 und Lys139.

Ein weiteres Kriterium für die Definition einer Interaktionsfläche war die Bildung eines zusammenhängendes Bereiches auf der Moleküloberfläche, in dem auch solche Residuen berücksichtigt wurden, deren Änderungen der chemischen Verschiebung unterhalb des Schwellenwertes lag. Dazu wurden die in Abbildung 46 identifizierten Bereiche Leu13 bis Asn21 und Ser31 bis His40 herangezogen. Zudem wurden Residuen berücksichtigt, die im Laufe der Titrationsmessungen zwar keine Änderung der chemischen Verschiebung, dafür signifikante Änderungen der Signalintensitäten

erfuhren. Dazu zählten Ala3, Arg24, Met43, Tyr46, Ile60 und Ala140, wobei nur Arg24, Met43 und Ile60 auch die vorangegangenen Kriterien erfüllten.

Abbildung 48 zeigt die Darstellung der Ergebnisse dieser Selektion anhand eines raumfüllenden Modells der Domäne AF6(1-141).

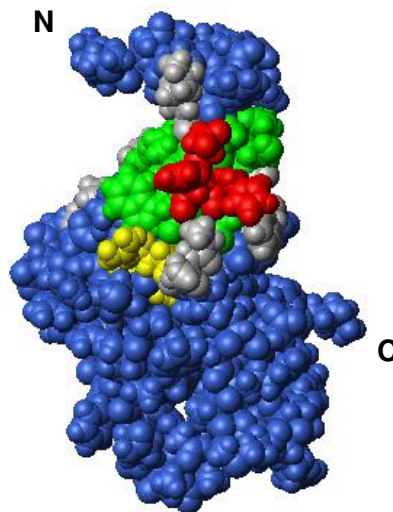


Abb. 48: Darstellung der Ergebnisse zur Selektion der für die Zo1-Interaktion relevanten Residuen von AF6(1-141). Zusammenhängende Bereiche signifikant verschobener Signale sind grün dargestellt. Aminosäuren mit den stärksten Signalverschiebungen sind rot, jene mit signifikanten Intensitätsänderungen gelb dargestellt. Grau hinterlegt sind nicht zugeordnete Reste. N- und C-Terminus sind beschriftet.

Die graphische Darstellung der Domäne zeigt, dass sich die meisten der selektierten Signaländerungen auf einen geschlossenen Bereich auf der Moleküloberfläche der AF6-Domäne beschränken. Diese mutmaßliche Interaktionsfläche liegt dabei in der N-terminalen Hälfte von AF6(1-141). Dabei fällt auf, dass jene Residuen, die die stärksten Signaländerungen aufwiesen, in dieser Interaktionsfläche eine zentrale Position einnehmen.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen am Hefe-Zellwandprotein Aga2

Die Agglutinin-Interaktion ist der zugrunde liegende Schlüsselmechanismus bei der ursprünglichsten Form der Zell-Zell-Adhäsion eukaryontischer Organismen, der Paarung von Hefezellen. Während Adhäsionsproteine höherer Lebewesen bereits ausführlich charakterisiert wurden, ist die derzeitige Kenntnislage hinsichtlich der Agglutinine eher dürftig. Dabei stellt hier vor allem das α -Agglutinin einen interessanten Forschungsgegenstand dar, denn während das komplementäre α -Agglutinin Homologien zu Proteinen anderer Organismen, wie zum Beispiel *C. elegans*, aufweist, handelt es sich bei Aga aufgrund des Fehlens homologer Proteine um einen einzigartigen Vertreter der Gruppe der Adhäsionsproteine [Hoyer et al., 1998]. Gerade die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur ist dabei von besonderen Interesse, da diese möglicherweise Rückschlüsse auf den Interaktionsmechanismus dieser Proteine zulässt und somit einen Einblick in die Funktionsweise dieser Art der Zell-Zell-Erkennung liefert.

Entscheidend für die Strukturaufklärung des α -Agglutinins ist zunächst die Etablierung eines Expressions- und Reinigungssystems, welches die Präparation von nativ gefalteten α -Agglutinin in Lösung erlaubt, um es der NMR-Spektroskopie zugänglich zu machen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze verfolgt.

4.1.1 Eigenschaften von Aga2

Für die Agglutinin-Interaktion ist die α -Agglutinin Untereinheit Aga2 verantwortlich. Da für NMR-spektroskopische Untersuchungen vorzugsweise möglichst kleine Proteine verwendet werden, wurde zunächst versucht, diese Untereinheit alleine zu präparieren. Zu diesem Zweck wurde die Gensequenz für Aga2 in ein pET-Expressionssystem integriert, um sie in *E. coli* heterolog exprimieren zu können. Der Grund für die heterologe Expression war die Tatsache, dass Aga2 *in vivo* mit einer umfangreichen Glykosylierung versehen ist, welche bei der NMR-Spektroskopie hinderlich wäre. Da diese Glykosylierung für die Funktion des Proteins nicht

erforderlich ist, wurde sie durch eine Expression in *E. coli* umgangen [Cappellaro et al., 1991]. Das pET-System wurde ausgewählt, um gegebenenfalls eine zellfreie Expression durchführen zu können.

Bei der klassischen zellulären Expression von Aga2 zeigte sich, dass das Protein ausschließlich in *Inclusion Bodies*, und somit in denaturierter Form, vorliegt. Hierfür wären zwei Gründe denkbar. So könnte das Protein eine geringe Stabilität aufweisen, was den Ergebnissen von Shen und Kollegen entsprechen würde [Shen et al., 2001]. Die Tatsache jedoch, dass das Protein quantitativ in unlöslicher Form vorliegt, spricht andererseits eher für eine starke Toxizität von Aga2 als Grund für dessen Akkumulierung in *Inclusion Bodies*.

Um die Hypothese der Zell-Toxizität zu überprüfen, wurde das Protein in einem zellfreien Expressionsansatz synthetisiert. Hier konnte Aga2 im Gegensatz zur klassischen zellulären Expression zum Teil löslich exprimiert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Protein eine geringe Stabilität besitzt, was in Verbindung mit der niedrigen Expressionsausbeute eine weitere Verwendung erschwerte.

Da für die NMR-Spektroskopie große Proteinmengen erforderlich sind, wurde zellulär exprimiertes Aga2 einer denaturierenden Aufreinigung unterzogen, mit welcher ausreichende Ausbeuten und eine hohe Reinheit erreicht wurden. Die Renaturierung des Proteins war erfolgreich, die Proteinaktivität konnte anhand eines Agglutinations-Assays nachgewiesen werden [siehe Diplomarbeit Gerald Bäuml, 2003]. Doch auch hier konnte eine schwache Stabilität des Proteins beobachtet werden. Eine eindimensionale Protonen-NMR-Messung ergab große Anteile an ungefaltetem Protein, was möglicherweise für dessen progressive Aggregation verantwortlich war.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Aga2 alleine nicht stabil ist. Da das Protein *in vivo* über zwei Disulfidbrücken mit seiner Anker-Untereinheit assoziiert ist, könnte diese Untereinheit für die Stabilität des Proteins essentiell sein. Zu diesem Ergebnis kamen auch Shen und Kollegen durch Aktivitätstests von Aga2 [Shen et al., 2001]. Ebenso wäre es denkbar, dass erst die Bindung an das komplementäre Ag α zu einer finalen Faltung von Aga2 führt. Dafür würden die Ergebnisse sowohl der NMR-Messung sowie des Agglutinations-Assay sprechen, wobei letzterer durch das Fehlen einer Positivkontrolle nicht quantifizierbar ist und somit die Aktivität auf einen möglicherweise kleinen Anteil regulär gefalteten Proteins zurückzuführen sein könnte.

Ferner wäre es denkbar, dass die Glykosylierung des Proteins *in vivo* zu seiner Stabilisierung beiträgt. Dagegen sprechen jedoch die oben genannten Ergebnisse der Aktivitätsmessungen von Cappellaro und Kollegen, da davon auszugehen ist, dass eine gleichbleibende Aktivität mit einer unveränderten Proteinfaltung korreliert [Cappellaro et al., 1991].

4.1.2 Auswirkungen der Co-Präparation von Aga1 und Aga2

Zum Zweck der Stabilisierung von Aga2 wurde eine Hypothese aufgestellt, gemäß derer das Protein für seine optimale Stabilität die assoziierte Anker-Untereinheit Aga1 benötigt. Um eine Assoziation dieser beiden Untereinheiten zu erreichen, wurden verschiedene Vorgehensweisen verfolgt.

Der klassische Ansatz bestand in einer Co-Expression von Aga1 und Aga2 in *E. coli*. Dabei stellte sich heraus, dass beide Untereinheiten zwar exprimiert wurden, jedoch wiederum in *Inclusion Bodies* und somit in einem denaturierten Zustand. Eine Dimerisierung der beiden Domänen konnte nicht beobachtet werden, was wohl auf das reduzierende Milieu des Cytoplasmas und die daraus resultierende erschwerte Ausbildung von Disulfidbrücken zurückzuführen ist. Um dennoch eine Dimerisierung zu erreichen, wurde durch Anfügen eines Transportsignals eine Translokation der Expressionsprodukte in den periplasmatischen Raum ermöglicht, in welchem ein oxidierendes Milieu vorherrscht. Durch diesen Ansatz wurde eine Dimerisierung der Aga-Untereinheiten erreicht, was eine erhöhte Stabilität zur Folge hatte. Der Nachteil dieser Methode war jedoch eine geringe Proteinausbeute, welche für Präparationen im NMR-kompatiblen Maßstab nicht ausreichte. Der Grund für diese niedrige Ausbeute liegt wahrscheinlich in der geringen Kapazität sowohl des intrazellulären Transportapparates als auch des periplasmatischen Raums, weshalb Optimierungsversuche hinsichtlich der Expressions- und Präparationsbedingungen erfolglos blieben.

Eine weitere Möglichkeit, Aga-Dimere zu generieren, war eine denaturierende Aufreinigung der unlöslich exprimierten Untereinheiten mit einer anschließenden vereinigten Rückfaltung. Das Resultat dieses Ansatzes war eine signifikante Steigerung des löslichen Anteils an Aga1 und Aga2 im Vergleich zur Renaturierung der einzelnen Untereinheiten. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung des Faltungszustandes ergab jedoch große Anteile an ungefalteten Protein. Die

gemeinsame Rückfaltung der Aga-Untereinheiten ermöglicht, wahrscheinlich durch deren Aneinanderlagerung, eine Verbesserung der Löslichkeit. Ein positiver Einfluss auf die Faltung des Proteins scheint damit nicht verbunden zu sein. Allerdings handelte es sich hierbei um ein künstlich gefaltetes Protein, welches somit nicht den Anspruch auf einen nativen Faltungszustand erhebt. Rückschlüsse auf die tatsächliche Struktur von Aga sind daher unzulässig.

Um die Möglichkeit der Synthese eines nativ gefalteten Proteins zu gewährleisten und die Ausbildung von *Inclusion Bodies* zu umgehen, wurde die Co-Expression von Aga1 und Aga2 im zellfreien System durchgeführt. Dieses Vorgehen hatte jedoch nicht den gewünschten Erfolg, da auch hier beide Untereinheiten unlöslich exprimiert wurden. Der Einsatz einer Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), welche die Ausbildung von Schwefelbrücken ermöglichen sollte, wirkte lediglich hemmend auf den Expressionsapparat, ohne einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit des Expressionsprodukts zu haben. Die Hemmung der Expression ist wahrscheinlich auf eine Destabilisierung systeminterner Proteine durch die PDI zurückzuführen.

Diese Resultate sprechen dafür, dass die Bindungs-Untereinheit Aga2 durch die Assoziation mit der Anker-Untereinheit Aga1 eine Stabilisierung erfährt, was sich mit den Ergebnissen der Aktivitätsuntersuchungen von Shen und Kollegen deckt [Shen et al., 2001].

4.1.3 Auswirkungen der gerichteten Mutagenese von Aga2

Mit dem Ziel der Synthese eines stabilen und nativ gefalteten Aga2 Proteins wurde versucht, durch gezielte Mutagenese die Stabilität und Löslichkeit von Aga2 zu verbessern. Die Grundlage für diesen Ansatz bildete eine Untersuchung von Lipke und Kollegen, die durch Mutagenese bestimmter Aminosäuren von Aga2 diejenigen Reste identifizierten, die an der Interaktion zum komplementären Ag α beteiligt sind. Dabei stellten sie fest, dass die Bindeaktivität bestimmter Aga2-Mutanten entgegen den Erwartungen höher war, als die des Wildtypproteins [Shen et al., 2001]. Daraus wurde eine Hypothese abgeleitet, gemäß derer die Aktivitätssteigerungen von Aga2 auf einer Erhöhung der Proteinstabilität durch gezielte Mutagenese bestimmter Aminosäuren beruht.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Mutation, welche die höchste Aktivitätssteigerung zur Folge hatte, in unser Konstrukt integriert. Es handelte sich

dabei um eine Punktmutation, die in einem Austausch von Tyrosin 39 zu Phenylalanin resultierte. Ein Vergleich dieser Mutante mit dem Wildtyp anhand einer zellfreien Expression ergab eine signifikante Zunahme des löslichen Anteils, was auf eine erhöhte Stabilität des Proteins schließen lässt. Im unlöslichen Anteil des Expressionsansatzes konnte ein Dimer aus Aga2-F nachgewiesen werden, welches wahrscheinlich durch Oxidation der Cysteine zustande kam.

Um eine Aggregation aufgrund der Interaktion der Cysteine zu verhindern, wurde zusätzlich durch gezielte Mutagenese eine Transformation beider Cysteine in Serine durchgeführt. Im Vergleich dieser Dreifachmutante Aga2-FSS mit den Varianten Aga2 und Aga2-F anhand eines *In Vitro* Expressionsansatzes konnte keine weitere signifikante Verbesserung der Löslichkeit gegenüber der Mutante Aga2-F festgestellt werden. Im Gegensatz zu dieser kam es jedoch wie erwartet zu keiner Bildung unlöslicher Homodimere. Somit konnte mit Hilfe der zellfreien Expression erstmals lösliches und mutmaßlich nativ gefaltetes rekombinantes Aga2 synthetisiert werden. Zur Quantifizierung der Ausbeute an gereinigtem Aga2-FSS wurde eine Präparation im kleinen Maßstab durchgeführt. Diese ergab, dass die Stabilität der Mutante für eine Aufreinigung ausreicht. Die Ausbeute jedoch war mit 3,5 µg/ml für NMR-spektroskopische Zwecke zu gering, was im Wesentlichen auf zwei Gründe zurückzuführen ist. Zum einen entspricht der Codon-Gebrauch der Aga2-Sequenz nicht der Auswahl an tRNAs der *E. coli* basierten *In Vitro* Expressionsansätze, was zwangsläufig zu Engpässen während der Proteinsynthese führt. Zum anderen reicht die Syntheseleistung der zellfreien Expression generell aufgrund systematischer Schwächen noch nicht an die der klassischen zellulären Expression heran.

Aus diesem Grund wurde zur NMR-kompatiblen Präparation von Aga2-FSS auf eine Expression in *E. coli* zurückgegriffen. Hierbei stellte sich allerdings heraus, dass eine Anzucht der Bakterien nur bei absoluter Restriktion einer basalen Expression von Aga2-FSS möglich ist. Die Induktion der Proteinexpression bewirkte in den meisten Fällen eine Lyse der Zellen. Ein Klon, welcher von diesem Phänomen verschont blieb, überlebte offensichtlich nur durch die quantitative Entfernung des Zielproteins aus dem Cytoplasma durch die Akkumulierung in *Inclusion Bodies*. Diese Beobachtungen lassen sich durch eine starke Toxizität des Proteins Aga2-FSS erklären, welche selbst bei einer geringen Expressionsrate das Zellwachstum behindert, indem es offensichtlich zum Zelltod führt. Die Abnahme der optischen Dichte nach Expressionsinduktion lässt auf eine Zelllyse schließen, die üblicherweise

durch ein Aufbrechen der Zellwand zustande kommt. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann, ähnlich dem Mechanismus der β -Laktam-Antibiotika, die Synthese der Zellwand wachsender Zellen gestört werden. Demnach wäre es denkbar, dass Aga2-FSS ein bestimmtes Protein hemmt, welches für die Zellwandsynthese essenziell ist. Zum anderen könnte, zumindest theoretisch, Aga2-FSS selbst für einen Abbau der Zellwand verantwortlich sein, was jedoch aufgrund fehlender enzymatischer Eigenschaften des Proteins unwahrscheinlich ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Lyse der Zellen auf eine gestörte Wasserregulierung zurückzuführen ist, welche letztendlich zum Platzen der Zellen führt. Dabei könnte Aga2-FSS durch eine Interaktion mit Proteinen, die für den Wasserhaushalt verantwortlich sind, eine Rolle spielen. Eine abschließende Beantwortung dieser Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden.

Die Tatsache, dass diese Beobachtungen lediglich bei der Mutante Aga2-FSS und nicht beim Wildtyp Aga2 auftraten, wirft außerdem die Frage auf, warum die toxische Wirkung des Proteins erst durch die Einführung der Mutationen entstanden ist. Da das Protein in seinem Urzustand eine deutlich verminderte Stabilität besaß, ist es wahrscheinlich, dass es zwar per se ebenfalls toxisch war, was aufgrund der Instabilität jedoch keine Auswirkungen hatte. Erst durch die gezielte Mutagenese, die eine Stabilitätssteigerung zur Folge hatte, konnte sich die toxische Wirkung entfalten. Dies bedeutet in letzter Konsequenz, dass eine Expression von nativem Aga2 *in vivo* - zumindest in prokaryontischen Systemen - nicht möglich ist. In seinem natürlichen Habitat, der Bäckerhefe, hat diese Toxizität aufgrund der Kompartimentierung eukaryontischer Zellen keine Bedeutung.

Um dennoch Probenmaterial für die NMR-Spektroskopie zu erhalten, wurde die Mutante Aga2-FSS aus den *Inclusion Bodies* der zellulären Expression unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend rückgefaltet. Auch hier zeigte sich, analog zu den *In Vitro* Expressionen, eine höhere Stabilität des renaturierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp, was möglicherweise auf eine native Faltung schließen lässt. Ein eindimensionales Protonenresonanzspektrum zeigte jedoch große Bereiche ungefalteten Proteins.

Zur Ermittlung der Quartärstruktur von Aga2-FSS wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt. Diese ergab, dass das Protein in großen Aggregaten vorliegt. In Kombination mit den Resultaten aus der NMR-Spektroskopie würde das bedeuten,

dass Aga2-FSS aufgrund seiner ungefalteten Regionen zur Aggregation neigt, wobei diese Aggregate eine lösliche Form aufweisen. Doch auch hier muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass es sich hierbei aufgrund der denaturierenden Präparation um ein synthetisch gefaltetes Protein handelt und somit Fehlfaltungen nicht auszuschließen sind, was eine Übertragung dieser Beobachtungen auf nativ gefaltetes Aga2 nur eingeschränkt zulässt.

4.2 Die Interaktion von ZO-1 und AF6

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe zahlreicher Untersuchungen viele Erkenntnisse über die Interaktion des Ras-Effektors AF6 mit dem Tight-Junction Protein ZO-1 gewonnen werden.

Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Identifikation der AF6-bindenden Domäne von ZO-1, da dies mögliche Rückschlüsse auf die Funktion von ZO-1 und insbesondere auf dessen regulatorische Eigenschaften zulässt.

4.2.1 Klonierung und Präparation der Proteinkonstrukte

Wie Yamamoto und Kollegen bei der Identifizierung der ZO-1 bindenden AF6-Domäne feststellten, liegt die komplementäre AF6-Bindedomäne in der N-terminalen Hälfte von ZO-1. Da diese jedoch über fünf verschiedene konservierte Domänen verfügt, welche alle für eine Protein-Protein-Interaktion in Frage kommen würden, musste der gesuchte Bereich des Proteins so weit wie möglich eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurden diverse Expressionskonstrukte angefertigt, welche bestimmte Anforderungen zu erfüllen hatten. So mussten sämtliche Expressionsprodukte in löslicher Form und in ihrem nativen Faltungszustand vorliegen. Für NMR-spektroskopische Untersuchungen mussten die Proben eine Proteinkonzentration von mindestens 100 μM aufweisen, um eine ausreichend hohe Auflösung der Spektren zu gewährleisten. Für Titrationsexperimente war durch den Verdünnungseffekt eine noch höhere Konzentration erforderlich. Für Interaktionsexperimente war es ferner notwendig, dass sämtliche Proteinproben im selben Puffer vorliegen, um pufferbedingte Artefakte ausschließen zu können.

Im Falle von AF6 lagen bereits fertige Expressionsplasmide vor, die von der Arbeitsgruppe um Christian Hermann (MPI Dortmund) zur Verfügung gestellt wurden: AF6(1-141), welches als Ras-Bindedomäne identifiziert und ausgiebig charakterisiert wurde [Guido Steiner, Dissertation 2001, und Ralph Elsner, Dissertation 2006] und AF6(36-206), welches Yamamoto und Kollegen als Zo1-Bindedomäne identifizierten [Yamamoto et al., 1997]. Beide Proteine konnten auf identische Art und Weise exprimiert und gereinigt werden. Ihre Stabilität bei Raumtemperatur war gering, was bei längerer Exposition im NMR-Spektrometer zu Aggregationen führte.

Zur Identifizierung der AF6-Bindedomäne von ZO-1 wurden mehrere Konstrukte angefertigt, welche unterschiedliche Domänen von ZO-1 aufwiesen.

4.2.1.1 Die N-terminale Hälfte von ZO-1

Yamamoto und Kollegen identifizierten die ZO-1 bindende Domäne von AF6 unter Verwendung eines Konstrukts, welches die N-terminale Hälfte von ZO-1 als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) darstellt [Yamamoto et al., 1997]. Dieses als ZO-1-k bezeichnete Konstrukt wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Kozo Kaibuchi (Kyoto University) zur Verfügung gestellt, um die Interaktion mit AF6 zu charakterisieren.

Dazu musste das Protein exprimiert und in möglichst hoher Reinheit sowie, gerade für NMR-spektroskopische Experimente, ausreichender Menge präpariert werden. Dabei kam es bei der Überexpression in *E. coli* zu zahlreichen Proteinfragmenten, was durch eine drastische Verringerung der Expressionsrate behoben werden konnte. Dieses Auftreten von Proteinfragmenten während der Expression könnte durch einen erhöhten proteolytischen Abbau erklärt werden. Die Tatsache jedoch, dass eine Verlangsamung der Expression zu einer Verbesserung führte, lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei nicht um das Ergebnis einer Proteolyse handelte, sondern dass diese Proteinfragmente das Resultat einer unvollständigen Translation der synthetisierten mRNA darstellen. Dies könnte mit einer Überlastung des Syntheseapparates erklärt werden, welche durch die Größe des Proteins bedingt ist. Bei der Reinigung des Proteins stellte sich heraus, dass ein Großteil nicht an die Affinitäts-Säule bindet. Ferner war der Thrombin-Verdau des Fusionsproteins unvollständig. Wie sich herausstellte, waren die gereinigten Proteinfractionen mit großen Mengen an DNA verunreinigt, welche selbst durch einen vorangeschalteten

DNAse-Verdau nicht beseitigt werden konnten. Eine DNA-Bindung von ZO-1 wäre eine Erklärung für diese Phänomene, da eine assoziierte DNA sowohl bei der Bindung des Proteins an die Säule, als auch beim Protease-Verdau hinderlich wäre. Ebenso wäre diese DNA durch die Bindung des Proteins auch vor einem DNAse-Verdau geschützt. Ein Datenbank-Abgleich der Zo1-Sequenz mittels *MotivScan* zeigt, dass ZO-1 im Bereich zwischen den Aminosäuren 748 und 765, also in der GuK-Domäne, ein Nuclear Lokalisation Signal (NLS) aufweist. Dies würde tatsächlich auf eine spezifische DNA-Interaktion hindeuten, was die Beobachtung der kernnahen Lokalisation von ZO-1 und seine mutmaßliche Signalfunktion erklären würde [Polette et al., 2005].

4.2.1.2 Die ZO-1 Domänen SH3 und GuK

Da für alle anderen Domänen von ZO-1 bereits Interaktionspartner identifiziert wurden, schlugen Yamamoto und Kollegen als potentielle Bindungsdomäne für AF6 die SH3 Domäne vor. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst diese Domäne untersucht.

Da Sekundärstrukturvorhersagen strukturierte Bereiche auch außerhalb der SH3 Domäne voraussagten, wurde mittels RT-PCR ein Konstrukt angefertigt, welches vom Ende der dritten PDZ Domäne bis zum Anfang der GuK Domäne reichte. Dieses Konstrukt wurde als SH3-I bezeichnet.

Zur Expression wurde dieses Konstrukt in den Vektor pET20 eingebracht, da das pET-System erfahrungsgemäß sehr hohe Expressionsraten zulässt, welche sich durch Expressionstests bestätigten. Das synthetisierte Protein lag jedoch ausschließlich ungefaltet vor, was selbst durch zahlreiche Optimierungsversuche nicht zu ändern war. Dafür lag das Protein bereits in sehr hoher Reinheit vor, da es den größten Anteil des zellulären Gesamtproteins darstellte. Die Reinigung erwies sich demnach als entsprechend unproblematisch, es bedurfte lediglich eines nativen Aufschlusses, welcher eine Abtrennung sämtlicher cytoplasmatischer Proteine erlaubte, gefolgt von einer Denaturierung der unlöslichen *Inclusion Bodies*. Eine klassische Chromatographie war nicht notwendig. Bei der Rückfaltung des Proteins kam es teilweise zu Präzipitationen, was hinsichtlich der hohen Expressionsrate und des geringen Reinigungsverlustes kein Problem darstellte.

Zur Präparation für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde SH3-I in Neidhardt-Minimalmedium exprimiert. Dazu wurden aufgrund der hohen Ausbeute lediglich 100 ml an ^{15}N -markiertem Medium benötigt.

Die Vorteile dieser starken Expression waren somit die schnelle und effektive Präparation des Proteins sowie eine kostengünstige Isotopenmarkierung. Nachteilig war jedoch die Tatsache der Denaturierung und Rückfaltung des Proteins, da hierbei Fehlfaltungen nicht auszuschließen sind, und somit experimentell ermittelte Eigenschaften dieses Proteins keine zwingenden Rückschlüsse auf seine tatsächliche Funktion zulassen. Die Konstruktion einer löslichen SH3 Domäne wäre hier auch für eine Strukturaufklärung von Vorteil, da eine dreidimensionale Struktur dieser Domäne bislang nicht existiert.

Daher wurde zur Synthese einer löslichen und nativ gefalteten SH3 Domäne ein Konstrukt angefertigt, welches die SH3 Domäne und die GuK Domäne umfasste und als SG bezeichnet wurde. Als Expressionssystem kam diesmal anstelle des pET-Systems der Vektor pGEX 4T1 zum Einsatz, welcher über ein N-terminales GST-Fusionsprotein verfügt, wodurch man sich eine verbesserte Löslichkeit versprach.

Bei der Expression dieses Konstruktes konnte lösliches Protein erst durch ein Absenken der Expressionstemperatur auf 25°C in nennenswertem Maße erhalten werden, was sich folglich nachteilig auf die Expressionsrate auswirkte. Zudem gestaltete sich die Reinigung als problematisch, da das Protein nicht quantitativ an die Säule gebunden werden konnte und auch der Thrombin-Verdau nur unzureichende Resultate brachte. Wie sich herausstellte, waren in den Proteinfractionen, ebenso wie bei der N-terminalen Hälfte ZO1-k, große Mengen an DNA zu finden.

Um zu überprüfen, ob diese DNA unspezifisch an SG assoziiert ist, wurde ein Formaldehyd-Crosslink durchgeführt, welcher anhand eines silbergefärbten Gels ausgewertet wurde. Dieser Versuch ergab eine starke Retardation der SG-Bande, was auf eine kovalente Bindung zwischen DNA und Protein zurückzuführen war, die auf einer unmittelbaren Nähe beruhte, wie sie bei einer DNA-Protein-Bindung zustande kommt. Eine Assoziation der SG Domäne an DNA ist somit sehr wahrscheinlich. Wie eine Untersuchung der Proteinsequenz auf konservierte DNA-Bindemotive ergab, verfügt die ZO-1 über ein NLS-Motiv, welches in der GuK Domäne liegt.

Ursprünglich handelt es sich bei der Guanylatkinase um ein essentielles Enzym des Purinnukleotid-Stoffwechsels, das die reversible Übertragung der terminalen Phosphatgruppe von ATP zu GMP katalysiert. Die GuK-Domänen der MAGUK-Proteine weisen zu diesem Enzym eine Sequenzidentität von 33 – 37% auf und zeigen keine messbare Guanylatkinase-Aktivität [Spangenberg, 2001]. Stattdessen deuten Untersuchungen darauf hin, dass die GuK-Domäne nur noch eine strukturelle Funktion als Protein-Bindungsdomäne besitzt. So haben Fanning und Kollegen entdeckt, dass die Domänen SH3 und GuK in ZO-1 eine intramolekulare Interaktion eingehen, und dass dieses Modul für die Bindung von ZO-1 an Occludin verantwortlich ist [Fanning et al., 2006]. Zusammen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit würde das bedeuten, dass die GuK-Domäne von ZO-1 sowohl für die nukleare Lokalisation als auch für die Bindung an Occludin eine Rolle spielt.

4.2.1.3 Die PDZ-Domänen von ZO-1

Die Annahme, dass für die Interaktion mit AF6 die SH3 Domäne von ZO-1 verantwortlich sei, war auf eine Vermutung Yamamotos zurückzuführen. Da dies jedoch als nicht gesichert galt und somit die Möglichkeit bestand, dass diese Interaktion durch eine andere Domäne verursacht wird, wurde ein Konstrukt angefertigt, welches als P2P3 bezeichnet wurde und die zweite und dritte PDZ Domäne von ZO-1 beinhaltet. Als Expressionssystem wurde auch hier der Vektor pGEX 4T1 gewählt.

Im Gegensatz zur Domäne SG konnte dieses Protein in größerer Menge in löslicher Form exprimiert werden, wenngleich sowohl Expressionsdauer als auch –temperatur möglichst gering gehalten werden mussten. Zur Präparation des Proteins genügte eine einstufige Affinitätschromatographie, um ausreichende Mengen bei hoher Reinheit zu gewinnen. Dies erlaubte eine Präparation im NMR-Maßstab. Das Protein zeigte auch in hohen Konzentrationen eine gute Löslichkeit und eine hohe Stabilität, weshalb es für NMR-Experimente geeignet war. Zur Bewertung der Proteinfaltung wurde ein eindimensionales Protonenresonanzspektrum angefertigt. Dieses bestätigte eine gute Faltung des Proteins. Eine nähere Charakterisierung dieses Konstruktes wurde aus organisatorischen Gründen nicht vorgenommen.

Um die Domäne P2P3 weiter einzugrenzen, wurde ein Konstrukt erzeugt, welches ausschließlich die dritte PDZ Domäne von ZO-1 enthielt und somit als P3 bezeichnet

wurde. Die Expression dieses Proteins konnte im Gegensatz zu P2P3 bei 37°C durchgeführt werden, was eine höhere Proteinausbeute zur Folge hatte. Die Reinigung konnte unter identischen Bedingungen durchgeführt werden, wobei hier durch das Ausbleiben von Abbaubanden eine noch höhere Reinheit erzielt werden konnte. Die Löslichkeit und Stabilität dieses Konstruktes entsprach jener von P2P3, was auch hier einen Einsatz bei NMR-spektroskopischen Titrationsexperimenten ermöglichte.

Die Domäne P2⁺ stellte die P2P3 Domäne ohne PDZ3 dar, sie bestand somit aus der zweiten PDZ Domäne und dem gesamten Bereich zwischen PDZ2 und PDZ3. Dies wurde so gewählt, da die zweite PDZ Domäne als Dimerisierungsdomäne identifiziert wurde [Utepbergenov et al., 2006], und somit auch diese Zwischendomäne für eine Interaktion mit AF6 verantwortlich sein könnte. Die hohen Expressionsraten und die ausgezeichnete Löslichkeit dieser Domäne ließen auch hier NMR-spektroskopische Untersuchungen zu.

4.2.2 Bewertung der Resultate aus den Interaktionsexperimenten

Um die Interaktion von ZO-1 und AF6 untersuchen zu können, war es zunächst notwendig, die AF6-Bindedomäne von ZO-1 zu identifizieren. Da für diese Interaktion mehrere Bereiche des Multidomänenproteins ZO-1 in Frage kamen, wurden verschiedene Proteinkonstrukte angefertigt. Zur Identifizierung der gesuchten Domäne wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, wozu sowohl proteinbiochemische Methoden als auch die NMR-Spektroskopie zum Einsatz kamen.

4.2.2.1 Pulldown-Assays

Mit Hilfe sogenannter Pulldown-Assays können stabile Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden. Dabei liegt der Vorteil dieser Methode darin, dass sie mit relativ geringem Zeit- und Materialaufwand durchgeführt werden kann. Da hierfür lediglich geringe Mengen an Protein notwendig waren, konnten auch solche Domänen auf eine eventuelle Interaktion getestet werden, welche niedrige Präparationsausbeuten aufwiesen.

Als AF6 Komponente wurde die Domäne AF6(36-206) verwendet, da diese von Yamamoto und Kollegen als ZO-1-Bindedomäne identifiziert wurde [Yamamoto et al., 1997]. Als ZO-1 Komponenten kamen die Konstrukte ZO-1-k, SG, P2P3 und P3 zum Einsatz.

Ein weiterer Grund, der für den Einsatz von Pulldown-Assays sprach, war die Tatsache, dass die Identifizierung der ZO-1-Bindedomäne ebenfalls mit Hilfe dieses Verfahrens durchgeführt wurde, indem verschiedene AF6-Konstrukte zu einer immobilisierten N-terminalen Hälfte von ZO-1, welche exakt dem Konstrukt ZO1-k entsprach, gegeben wurden. Nach einem einmaligen Waschschrift ergab die Analyse der Eluate Spuren von AF6(36-206).

Die vorliegenden Resultate dieses Versuchs entsprachen jedoch nicht den Erwartungen, da mit keiner der genannten Domänen eine Protein-Protein-Bindung zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Und obwohl sowohl die Proteindomänen AF6(36-206) und ZO1-k als auch die Versuchsdurchführung mit den von Yamamoto verwendeten übereinstimmte, konnten dessen Ergebnisse nicht reproduziert werden. Dies könnte mit einer möglicherweise nur schwachen Interaktion der beteiligten Proteine erklärt werden, welche dazu führt, dass durch progressives Waschen der Sepharose-Beads die bindende Proteinkomponente mehr und mehr ausverdünnt wird. Ein einmaliges Waschen, wie von Yamamoto durchgeführt, reduziert dabei den Verdünnungseffekt, was einen Nachweis des putativen Bindepartners ermöglicht. Allerdings erhöht sich durch den vermehrten Anteil an Verunreinigungen die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Resultaten. Da dies eine exakte Analyse der Proteininteraktionen mit dieser Methode unmöglich machen würde, mussten weitere Verfahren durchgeführt werden.

4.2.2.2 Crosslink-Assays

Protein-Protein-Crosslinks ermöglichen den Nachweis transienter Interaktionen, indem Proteine, die in direkter Nähe zueinander stehen, durch bifunktionale Reagenzien kovalent miteinander verbunden werden. Zu diesem Zweck wurde als Linker Glutaraldehyd eingesetzt, welches wasserlöslich ist und irreversible Verbindungen ausbildet, was eine Auftrennung verlinkter Proteinkomplexe durch Reduktionsmittel unmöglich macht. Außerdem stellt Glutaraldehyd einen

vergleichsweise kurzen Linker dar, eine Tatsache, die beim Auftreten negativer Ergebnisse in Betracht gezogen werden sollte.

Proteinkonstrukte, die mit Hilfe dieses Verfahrens auf eine Interaktion getestet wurden, waren AF6(36-206) und ZO1-k sowie P2P3. Bei der Untersuchung der N-terminalen Hälfte ZO1-k zeigte sich, dass das ZO1-k Monomer nicht mehr nachzuweisen war, wohingegen eine Bande auftauchte, die auf der Höhe eines ZO1-k Homodimers lief. Die AF6 Domäne blieb unverändert in ihrem monomeren Zustand. Die Ergebnisse bezüglich der Domäne P2P3 entsprachen im Prinzip jenen von ZO1-k.

Diese Beobachtungen können mit der Tatsache erklärt werden, dass ZO-1 über seine zweite PDZ-Domäne Dimere ausbilden kann [Utepbergenov et al., 2006], was möglicherweise eine Bindung an AF6 verhindert. Da es sich bei Glutaraldehyd um einen vergleichsweise kurzen Linker handelt, müssen die Lysine im Komplex eng benachbart vorliegen. Ist dies bei der Interaktion von AF6 und ZO-1 nicht der Fall, könnte dies eine Erklärung für die vorliegenden Resultate sein.

Eine Interaktion zwischen ZO-1 und AF6 konnte mit Hilfe dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Ein Beweis für die Nicht-Existenz einer solchen Interaktion jedoch ist auf diese Weise ebenfalls nicht möglich.

4.2.2.3 Analytische Gelfiltration

Die analytische Größenausschlusschromatographie bietet die Möglichkeit, eine gegenseitige Bindung zweier Proteine nachzuweisen, da diese im assoziierten Zustand weniger mit den Gelporen interagieren und somit schneller das Säulenvolumen passieren, als im monomeren Zustand.

Domänen, die mit dieser Methode auf eine Interaktion untersucht wurden, waren AF6(1-141) und ZO-1-P2⁺ sowie P2P3. Die Ergebnisse dieser Versuche sind nicht eindeutig zu interpretieren, da sich die Signale des Säulenchromatogramms, die mit den beiden Domänen in Verbindung gebracht werden können, aufgrund ähnlicher Größe überschneiden. Dies führt zwangsläufig zu Fraktionen, welche beide Proteine enthalten, ohne dass dabei eine Interaktion nötig wäre. Abgesehen davon könnte man auch bei einem eindeutig negativen Ergebnis nicht auf eine fehlende Interaktion schließen, wenn diese mit einer hohen Dissoziation einhergeht. Somit ist diese Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen für unsere Zwecke ungeeignet.

4.2.2.4 Fluoreszenztitration

Da AF6(1-141) zwei Tryptophane besitzt, welche als intrinsische Fluorophore dienen können, bestand die Möglichkeit, sich diese Fluoreszenz für eine Titration mit einer ZO-1 Domäne, die kein Tryptophan enthält, nutzbar zu machen. Wenn es hier zu einer Interaktion dieser beiden Proteine kommen würde, würde sich dies in einer Änderung des Emissionsspektrums bemerkbar machen.

Für diesen Versuch wurde die ZO-1 Domäne P2⁺ ausgewählt, da diese kein Tryptophan besitzt, sondern lediglich ein Phenylalanin und zwei Tyrosine, welche jedoch wegen ihrer unterschiedlichen Extinktions- und Emissionsmaxima nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis der Titration haben sollten. Dennoch zeigte sich, dass P2⁺ eine, wenn auch vergleichsweise schwache, Emission aufweist, die sich im Laufe der Titration in ihrer Intensität zur Emission von AF6 addiert. Es konnte also kein Effekt beobachtet werden, der auf eine Interaktion der beiden Proteine schließen lässt. Dies könnte damit erklärt werden, dass es sich hierbei möglicherweise um eine lediglich schwache Interaktion handelt, deren Effekt durch Verunreinigungen in den Proteinlösungen - beispielsweise durch Reste der Thrombin-Protease - überdeckt wird. Eine bessere Methode, um Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie identifizieren zu können, wäre durch Anheftung eines externen Fluorophors, da dieser gezielt angeregt werden kann und somit gegenüber etwaigen Verunreinigungen wesentlich unempfindlicher ist.

4.2.2.5 NMR-Titrationsexperimente

Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, selbst schwache Interaktionen von Proteinen sichtbar zu machen. Dazu müssen die verwendeten Proteinlösungen bestimmte Anforderungen erfüllen. Zum einen müssen beide Interaktionspartner unter identischen Pufferbedingungen vorliegen, um Artefakte auszuschließen. Zum anderen ist neben einer möglichst hohen Reinheit der Proteinlösungen eine hohe Konzentration notwendig, um mit geringem Zeitaufwand eine möglichst hohe Auflösungen der Spektren zu erreichen. Zur Durchführung sogenannter HSQC-Titrationsmessungen muss zudem ein Interaktionspartner eine ¹⁵N-Markierung aufweisen.

Zur Identifizierung einer möglichen AF6-Bindedomäne wurde eine Reihe solcher HSQC-Messungen durchgeführt. Um die Signaldichte der Spektren einzuschränken, wurde dazu auf TROSY-Messungen zurückgegriffen.

Zunächst wurde die von Yamamoto und Kollegen als ZO-1 Bindedomäne identifizierte Domäne AF6(36-206) mit der ZO-1 Domäne P2P3 titriert. Dabei traten zum Teil erhebliche Signaländerungen auf, welche auf eine Interaktion der beteiligten Proteine schließen lassen.

Bezüglich des ZO-1 Proteinkonstrukts konnte so eine Einschränkung der mit AF6 interagierenden Domäne vorgenommen werden. Diese musste im Bereich der zweiten oder dritten PDZ-Domäne liegen.

Da eine sequenzielle Zuordnung für den als Ras-Bindedomäne identifizierten Bereich AF6(1-141) vorlag, wurde eine weitere Messreihe mit dieser Proteindomäne durchgeführt. Auch diese ergaben deutliche Änderungen der chemischen Verschiebungen, was darauf schließen lässt, dass die Ras-Bindedomäne von AF6 mit der ZO-1-Bindedomäne identisch ist. Zudem konnte nun die Zuordnung der Signale vorgenommen werden und mit Hilfe des Programms AUREMOL die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Durch die graphische Darstellung dieser Ergebnisse anhand eines pdb-Modells wurde eine gut abgegrenzte Interaktionsfläche deutlich sichtbar, welche sich in der N-terminalen Hälfte von AF6(1-141) befindet. Da für diese Domäne jedoch bereits Interaktionen mit Ras und Rap1a nachgewiesen und die dafür verantwortlichen Interaktionsflächen identifiziert wurden [Ralf Elsner, Dissertation 2006], stellt sich nun die Frage nach der relativen Anordnung dieser Bindungsregionen auf der Oberfläche von AF6. Tabelle 7 zeigt die Regionen von AF6, die für die jeweiligen Interaktionen mit Ras, Rap1a und ZO-1 verantwortlich sind.

Interaktionsflächen von AF6(1-141)					
Rap1a		ZO-1		Ras	
		13	LEU		
		14	ALA		
		15	ASP		
		16	ILE		
		17	ILE		
		18	HIS		
19	HIS	19	HIS		

		20	TRP		
21	ASN	21	ASN		
24	ARG	24	ARG		
25	LEU				
		31	SER		
		32	GLN		
		33	PRO		
		34	THR		
		35	GLU		
		36	ASP		
		37	LEU		
		38	GLU		
		39	PHE		
		40	HIS		
		43	MET		
44	ARG			44	ARG
				46	TYR
54	ASN			54	ASN
				56	ALA
57	THR			57	THR
58	LYS			58	LYS
59	CYS				
		60	ILE		
77	GLU			77	GLU
78	LYS			78	LYS
79	PHE			79	PHE
80	ARG				
82	ASP				
84	ARG			84	ARG

Tab. 7: Aminosäuren von AF6, die für die Interaktionen mit Rap1a, ZO-1 und Ras verantwortlich sind. Residuen, die sowohl bei der Rap1a-, als auch bei der Zo1-Bindung beteiligt sind, sind dabei grün hinterlegt. Blau markiert sind Reste, die bei der Rap1a- und bei der Ras-Bindung beteiligt sind.

Wie in Tabelle 7 zu sehen ist, weisen die an der Bindung an Ras und Rap1a beteiligten Regionen viele Übereinstimmungen auf, was auf die Homologie dieser beiden Proteine zurückzuführen ist. Dagegen zeigen sich in dem Bereich, der für die ZO-1-Interaktion verantwortlich ist, nur wenige Übereinstimmungen mit den Ras- oder Rap1a-Bindungsflächen, nämlich die Residuen His19, Asn21 und Arg24,

welche einen Bindungsbereich darstellen, der nur bei der Interaktion mit Rap1a, nicht jedoch mit Ras, beteiligt ist. Auffällig ist zudem die Tatsache, dass die beiden Bereiche für die Bindung von ZO-1 und Ras/Rap1a in der sequenziellen Anordnung direkt nebeneinander liegen, wobei die Grenze zwischen beiden Bereichen die Aminosäuren Met43 und Arg44 bilden. Abbildung 49 zeigt die Darstellung der Interaktionsflächen von ZO-1 und Rap1a anhand eines Homologiemodells.

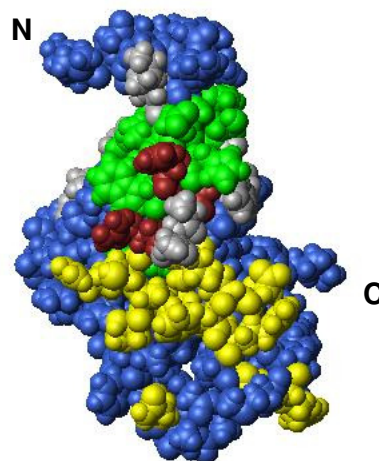


Abb. 49: *pdb-Modell von AF6(1-141). Dargestellt sind die Interaktionsflächen für die Bindung an ZO-1 (grün) und an Rap1a (gelb). Residuen, die an beiden Bindungen beteiligt sind, sind braun markiert. Aminosäuren, die an keiner Bindung beteiligt sind, sind blau, nicht zugeordnete Reste grau dargestellt. N- und C-Terminus sind beschriftet.*

Die Anordnung der Bindungsstellen für ZO-1 und Rap1a auf der Oberfläche von AF6 zeigt, dass beide Interaktionsflächen eng benachbart liegen, wobei sich die Grenze zwischen beiden Flächen nicht allein auf den Bereich Met43 und Arg44 beschränkt, sondern auch Leu25, Lys58, Cys59, Lys78 sowie Ile60 beteiligt sind. Zu Überlappungen kommt es bei His19, Asn21 und Arg24. Diese unmittelbare Nähe der Interaktionsflächen hat zur Folge, dass eine gleichzeitige Bindung von ZO-1 und Ras/Rap1a an AF6 zu einer gegenseitigen Behinderung führen würde und somit ausgeschlossen werden kann. Die Konsequenz ist eine kompetitive Interaktion von AF6 an ZO-1 und Ras/Rap1a. Eine experimentelle Bestätigung dieses Ergebnisses konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden.

Zur näheren Eingrenzung der AF6-Bindedomäne von ZO-1 wurde das Proteinkonstrukt P3 einer Titrationsmessung unterzogen. Im Gegensatz zur Domäne

P2P3 konnten hier keine Signaländerungen beobachtet werden, was eine Interaktion von ZO-1 mit AF6 mittels dessen dritter PDZ-Domäne äußerst unwahrscheinlich macht. Diese Messreihe kann somit als Negativkontrolle zur Untermauerung der vorangegangenen Ergebnisse herangezogen werden.

Allerdings bestand die Möglichkeit, dass zur AF6-Bindung durch die dritte PDZ-Domäne eine Dimerisierung von ZO-1 notwendig ist, die durch die als Dimerisierungsdomäne identifizierte zweite PDZ-Domäne zustande kommt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Proteinkonstrukt P2⁺, welches aus der zweiten PDZ-Domäne und dem Bereich zwischen der zweiten und der dritten PDZ-Domäne besteht, einem Titrationsexperiment unterzogen. Dieses ergab Signalverschiebungen, die mit jenen der Messreihe von P2P3 identisch waren. Eine Beteiligung der dritten PDZ-Domäne an der Interaktion mit AF6 kann somit ausgeschlossen werden. Stattdessen scheint die zweite PDZ-Domäne diejenige zu sein, die für die Interaktion verantwortlich ist, obwohl diese bereits als Dimerisierungsdomäne identifiziert worden ist [Utepbergenov et al., 2006]. Andererseits muss aufgrund des Designs von P2⁺ die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass für die Interaktion der genannte Zwischenbereich verantwortlich ist. Eine definitive Festlegung der Bindungsdomäne kann anhand der vorliegenden Ergebnisse noch nicht vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wäre ein kürzeres Expressionskonstrukt nützlich, welches entweder die zweite PDZ-Domäne oder den Zwischenbereich enthalten müsste. Eine Alternative wäre die Anfertigung eines NMR-Spektrums von P2⁺ mit anschließender sequenzieller Zuordnung der Signale. Durch eine Titration dieses Proteins mit AF6 könnten so anhand dieser Zuordnung die an der Interaktion beteiligten Bereiche von ZO-1 eindeutig identifiziert werden.

4.2.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Funktion von AF6 und ZO-1

Da diese Ergebnisse ein völlig neues Licht auf die Funktion von AF6 und ZO-1 werfen, wurde ein neues Modell erstellt, welches sowohl die Erkenntnisse der letzten Jahre, als auch die Resultate, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, berücksichtigt.

Demnach spielt AF6 eine entscheidende Rolle bei der zielgerichteten Lokalisation von ZO-1 an die Stellen der Zytoplasmamembran, wo stabile Zell-Zell-Verbindungen

in Form von Tight-Junctions ausgebildet werden sollen [Miyahara et al., 2000]. Nach Fertigstellung der Tight-Junctions bleibt AF6 an ZO-1 assoziiert und dient so als Stabilisator dieser Zellstruktur, welche so lange aufrechterhalten werden muss, bis ein (extrazelluläres) Signal, zum Beispiel in Form eines Wachstumsfaktors, die Auflösung der Tight-Junctions zum Zwecke der Remodellierung erfordert. Dies geschieht, indem der Wachstumsfaktor durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor eine Signalkaskade induziert, im Laufe derer es zur Aktivierung von Ras (oder anderen Vertretern der Ras-Superfamilie) durch GTP-Beladung kommt. Aktiviertes Ras kann nun an AF6 binden, zu dem es eine starke Bindungsaffinität besitzt, und welches somit dem Tight-Junction-Multiproteinkomplex entzogen wird. Aus diesem Grund kommt es zu einer Destabilisierung dieses Komplexes und infolgedessen zur Auflösung der Tight-Junctions, welche möglicherweise durch eine Dimerbildung von ZO-1 durch dessen nun ungebundene zweite PDZ Domäne induziert wird [Utepbergenov et al., 2006]. Das nun zytoplasmatisch lokalisierte ZO-1 Dimer hat darauf hin die Möglichkeit, sich zum Zellkern zu begeben, wo es seine mutmaßliche Signalwirkung entfalten kann [Gottardi et al., 1996 und Islas et al., 2002]. Nach dem Wegfall des Signals und der damit verbundenen Inaktivierung von Ras kommt es zur Dissoziation des Ras-AF6 Komplexes, was eine Bindung von AF6 an ZO-1 und somit eine Neubildung stabiler Zell-Zell-Kontakte ermöglicht.

4.2.4 Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen AF6 und ZO-1 zweifelsfrei nachgewiesen werden. Zudem gelang es, die dafür verantwortlichen interagierenden Domänen dieser Proteine zu identifizieren, was die Konstruktion eines neuen Modells zur Beschreibung der molekularen Vorgänge, in die diese Proteine involviert sind, erlaubte. Somit wurde ein solides Fundament für die nähere Charakterisierung dieser Interaktion geschaffen. Um präzisere Aussagen hinsichtlich der regulatorischen Vorgänge treffen zu können, müssen weiterführende Arbeiten vorgenommen werden.

So muss eine Gegenditration von markiertem ZO-1 mit AF6 durchgeführt werden, zum einen zur Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse, zum anderen, um die an der Interaktion beteiligten Residuen von ZO-1 eindeutig zu identifizieren. Zudem wird ein experimenteller Beweis für die Konkurrenz von ZO-1 und Ras/Rap1a benötigt. Zu

diesem Zweck könnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine Titration von markiertem ZO-1 mit AF6 und anschließender Verdrängung durch aktiviertes Ras/Rap1a durchgeführt werden.

Zur Verifizierung des vorgestellten Modells müssen außerdem Kenngrößen ermittelt werden, die diese Interaktion beschreiben. Dazu gehört die experimentelle Bestimmung der Bindungskonstante, welche mit Hilfe der NMR-Spektroskopie durchgeführt werden kann. Dazu ist eine Titration notwendig, die eine Sättigung der Bindungsstellen zur Folge hat. Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung essentieller Daten ist die Isothermale Titrations-Kalorimetrie (ITC), die durch die Messung der bei der Wechselwirkung freiwerdenden (beziehungsweise verbrauchten) Reaktionswärme zudem die Bestimmung der Reaktionsenthalpie, der Stöchiometrie und der Reaktionsentropie erlaubt. Eine weitere Möglichkeit, um Informationen bezüglich dieser Proteininteraktion zu gewinnen, wäre der Einsatz eines BIAcore-Assays. Dabei wird nach dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz die Anreicherung eines Analyten an einem immobilisierten Liganden detektiert, wodurch Aussagen über die Bindungskinetik getroffen werden können.

Letztendlich wird die lückenlose Charakterisierung der Interaktion von AF6 und ZO-1 zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Mechanismen bei der Ausbildung stabiler Zell-Zell-Verbindungen führen, was wiederum als Basis für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden bei Erkrankungen, die mit Störungen zellulärer Verbindungen einhergehen, dienen kann.

5 Zusammenfassung

Die Ausbildung und Aufrechterhaltung interzellulärer Verbindungen ist ein entscheidendes Merkmal mehrzelliger Organismen. Eine Störung dieser Funktion führt dabei unweigerlich zu schwerwiegenden systemischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs. Die Kenntnis der molekularen Vorgänge bei der Bildung von Zell-Zell-Verbindungen ist deshalb von größter Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse hinsichtlich dieser zellulären Verbindungen zu gewinnen. Dabei wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen sollten durch NMR-spektroskopische Untersuchungen am Hefe-Zellwandprotein Aga2 von *Saccharomyces cerevisiae* Informationen über die ursprünglichste Form der Zelladhäsion, der Agglutination, gewonnen werden. Zu diesem Zweck sollte ein Präparationssystem etabliert werden, das es erlaubt, nativ gefaltetes, rekombinantes Aga2 in großer Menge und in Reinform zu synthetisieren, um es einer NMR-basierten Strukturaufklärung zugänglich zu machen. Dabei kamen sowohl die klassische zelluläre Expression in *E. coli*, als auch die zellfreie *In vitro* Expression zum Einsatz.

Dabei zeigte sich, dass Aga2 ausschließlich in ungelöster Form exprimiert wird. Eine denaturierende Präparation mit anschließender Rückfaltung ergab ein Protein, welches zu großen Teilen ungefaltet war. Aus diesem Grund wurde eine kombinierte Präparation von Aga2 und dessen Anker-Untereinheit Aga1 durchgeführt. Während eine Co-Expression keine Verbesserung hinsichtlich der Löslichkeit des Zielproteins ergab, wurde durch eine gemeinsame Renaturierung der beiden Proteine eine signifikante Verbesserung der Löslichkeit erreicht. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Stabilität von Aga2 war die gezielte Mutagenese bestimmter Aminosäuren des Proteins. So konnte durch die Austausche Y39F, C6S und C49S eine signifikante Steigerung der Löslichkeit und Stabilität von Aga2 erreicht werden. Allerdings stellte sich heraus, dass diese Mutante eine starke Zelltoxizität aufweist, die eine zelluläre Expression des nativ gefalteten Zielproteins unmöglich machte. Eine zellfreie Synthese des Proteins war dagegen erfolgreich. Es gelang erstmals, lösliches und somit mutmaßlich nativ gefaltetes Aga2 zu exprimieren. Die geringe Gesamtausbeute, die mit Hilfe dieser Methode erzielt werden konnte, erlaubte jedoch keine Präparation im NMR-kompatiblen Maßstab. Durch die denaturierende Präparation und Rückfaltung der Mutante konnte, wie bei der Co-Präparation mit

Aga1, eine Ausbeute an löslichem Zielprotein von nahezu 100% erreicht werden. Bei der Analyse dieses synthetisch gefalteten Proteins stellte sich heraus, dass es zwar eine hohe Stabilität aufweist, aber zu Aggregation neigt, was eine NMR-spektroskopische Untersuchung erheblich erschwert.

Ein weiterer Ansatz zur Gewinnung neuer Erkenntnisse hinsichtlich interzellulärer Verbindungen bestand in der Untersuchung der Regulation einer speziellen Art eukaryontischer Zell-Zell-Verbindungen, den sogenannten Tight Junctions. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Charakterisierung einer möglichen Interaktion zwischen dem Tight Junction Protein ZO-1 und dem Ras-Effektor AF6 gelegt, da es sich hierbei um eine potentielle Schnittstelle zwischen der Regulation von Zellwachstum und Proliferation und der Ausbildung und Aufrechterhaltung von zellulären Verbindungen handeln könnte. Zu diesem Zweck sollte mit geeigneten Methoden die Interaktion dieser beiden Proteine nachgewiesen werden. Zudem sollte die AF6-bindende Domäne von ZO-1 sowie der komplementäre Bereich auf der Oberfläche von AF6 identifiziert werden, um daraus mögliche Rückschlüsse auf die Funktion dieser beiden Komponenten im zellulären Kontext ziehen zu können.

Zu diesem Zweck wurden anhand biochemischer und biophysikalischer Methoden zahlreiche Interaktionsstudien durchgeführt. Dazu wurden Expressionskonstrukte angefertigt, die unterschiedliche konservierte Domänen von ZO-1 darstellten. Einige dieser Konstrukte konnten im NMR-gerechten Maßstab exprimiert und gereinigt werden. Dadurch war es möglich, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Interaktion von AF6 und ZO-1 zweifelsfrei nachzuweisen. Dabei gelang es, die zweite PDZ-Domäne von ZO-1, die in der Literatur als Dimerisierungsdomäne beschrieben wird, als AF6-Bindedomäne zu identifizieren. Durch Titrationsexperimente konnte außerdem die Ras-Bindedomäne 1-141 von AF6 als Zo1-Bindedomäne identifiziert werden. Durch die Isotopenmarkierung von AF6 war es zudem möglich, den für die Zo1-Interaktion verantwortlichen Bereich auf der Moleküloberfläche von AF6 einzugrenzen. Dieser liegt N-terminal in direkter Nachbarschaft zu der für die Ras/Rap1a-Bindung zuständigen Interaktionsfläche von AF6. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde schließlich ein neues Modell erstellt, das die Funktion der Interaktion von AF6 und ZO-1 im zellulären Kontext erklärt. Demnach reguliert Ras/Rap1a durch AF6 die ZO-1-abhängige Ausbildung interzellulärer Verbindungen.

6 Literaturverzeichnis

- Aijaz, S., Sanchez-Heras, E., Balda, M. S., Matter, K.** (2007) Regulation of tight junction assembly and epithelial morphogenesis by the heat shock protein Apg-2. *BMC Cell Biology* 8:49
- Anderson, C. W., Straus, J. W., Dudock, B. S.** (1983) Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods of Enzymology* 101, 635 – 644
- Akoyev, V., Takemoto, D. J.** (2006) ZO-1 is required for protein kinase C gamma-driven disassembly of connexin 43. *Cellular Signalling* 19, 958 – 967
- Bäumli, G.** (2003) Expression und Reinigung der Bindungsuntereinheit Aga2 des α -Agglutinins aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*. Universität Regensburg
- Balda, M. S., Matter, K.** (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO Journal* 19, 2024 – 2033
- Baranov V. I., Spirin, A. S.** (1993) Gene expression in cell free systems on preparative scale. *Methods of Enzymology* 217, 123 – 142
- Brock, T. D.** (1958) Mating reaction in the yeast *Hansenula wingei*. *Journal of Bacteriology* 75, 697 – 701
- Bretfeld, F.** (2004) Coexpression und Aufreinigung der α -Agglutinin Untereinheiten Aga1 und Aga2 von *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*. Universität Regensburg
- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M. T., Canaani, E., Baechi, T., Moelling, K., Hovens, C. M.** (1999) The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *Journal of Cell Biology* 144, 361– 371
- Buchert, M., Poon, C., King, J. A. J., Baechi, T., D'Abaco, G., Hollande, F., Hovens, C. M.** (2007) AF6/s-Afadin Is a Dual Residency Protein and Localizes to a Novel Subnuclear Compartment. *Journal of Cellular Physiology* 210, 212 – 223
- Burke, D., Mendonca-Previato, L., Ballou, C. E.** (1980) Cell-cell recognition in yeast: purification of *Hansenula wingei* 21-cell sexual agglutination factor and comparison of the factors from three genera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 318 - 322
- Cappellaro, C., Hauser, K., Mrsa, V., Watzele, M., Watzele, G., Gruber, C., Tanner, W.** *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO Journal* 10, 4081 – 4088
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., Tanner, W.** (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO Journal* 13, 4737 – 4744

- Chlenski, A., Ketels, K. V., Tsao, M. S., Talamonti, M. S., Anderson, M. R., Oyasu, R., Scarpelli, D. G.** (1999) Tight junction protein ZO-2 is differentially expressed in normal pancreatic ducts compared to human pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 82, 137 – 144
- Crandall, M., Brock, T. D.** (1968) Molecular basis of mating in *Hansenula wingei*. *Bacteriology Reviews* 32, 139 – 163
- Crandall, M., Lawrence, L. M., Saunders, R. M.** (1974) Molecular complementarity of yeast glycoprotein mating factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 26 – 29
- Cross, F., Hartwell, L. H., Jackson, C., Konopka, J. B.** (1988) Conjugation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Reviews of Cell Biology* 4, 429 – 457
- de Nobel, H., Lipke, P. N., Kurjan, J.** (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247, 409 – 415
- DeVries, J., Zubay, G.** (1967) DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the at-fragment of the enzyme β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1010 – 1012
- Ebnet, K., Schulz, C. U., Meyer zu Brickwedde, M.-K., Pendl, G. G., Vestweber, D.** (2000) Junctional Adhesion Molecule Interacts with the PDZ Domain-containing Proteins AF-6 and ZO-1. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 27979 – 27988
- Elsner, R.-P.** (2006) NMR-basierte Aufklärung der Strukturen von Ras-Bindedomänen und ihrer Wechselwirkungen mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A. *Dissertation*. Universität Regensburg
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., Anderson, J. M.** (1998) The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 29745 – 29753
- Fanning, A. S., Little, B. P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z., Anderson, J. M.** (2007) The Unique-5 and -6 Motifs of ZO-1 Regulate Tight Junction Strand Localization and Scaffolding Properties. *Molecular Biology of the Cell* 18, 721 – 731
- Fanning, A. S., Lye, M. F., Anderson, J. M., Lavie, A.** (2007) Domain Swapping Within PDZ2 Is Responsible For Dimerization Of ZO Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 37710 – 37716
- Farquhar, M. G., Palade, G. E.** (1963) Junctional complexes in various epithelia. *Journal of Cell Biology* 17, 375 – 412
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S.** (1994) Direct Association of Occludin with ZO-1 and Its Possible Involvement in the Localization of Occludin at Tight Junctions. *The Journal of Cell Biology* 127, 1617 – 1626

- Gaengel, K., Mlodzik, M.** (2003) Egfr signaling regulates ommatidial rotation and cell motility in the *Drosophila* eye via MAPK/ Pnt signaling and the Ras effector Canoe/AF6. *Development* 130, 5413– 5423
- González-Mariscal, L., Islas, S., Contreras, R. G., García-Villegas, M. R., Betanzos, A., Vega, J., Díaz-Quintero, A., Martín-Orozco, N., Ortiz-Navarrete, V., Cereijido, M., Valdes, J.** (1999) Molecular Characterization of the Tight Junction Protein ZO-1 in MDCK Cells. *Experimental Cell Research* 248, 97 – 109
- Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., Louvard, D.** (1996) The junction-associated protein zonula occludens-1 localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10779 – 10784
- Hagiya, M., Yoshida, K., Yanagishima, N.** (1977) The release of cell-specific substances for sexual agglutination from haploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Cell Research* 104, 263 – 272
- Hall, A.** (1994) A biochemical function for Ras – at last. *Science* 264, 1413 - 1414
- Harhaj, N. S., Antonetti, D. A.** (2003) Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1206 – 1237
- Hauser, K., Tanner, W.** (1989) Purification of the inducible α -agglutinin and molecular cloning of the gene. *FEBS Letters* 255, 290 – 294
- Herskowitz, I.** (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Reviews* 52, 536 – 553
- Hoyer, L. L., Payne, T. L., Bell, M., Myers, A. M., Scherer, S.** (1998) *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Current Genetics* 33, 451 – 459
- Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S.** (2005) Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *The Journal of Cell Biology* 176, 779 – 786
- Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., Nagafuchi, A.** (1999) Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell-adhesion. *Journal of Cell Biology* 144, 1311 – 1322
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L., Gonzales-Mariscal, L.** (2002) Nuclear localisation of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Experimental Cell Research* 274, 138 – 148
- Itoh, M., Furuse, M., Morita K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S.** (1999) Direct binding of three tight-junction associated MAGUKs ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH-termini of claudins. *Journal of cell biology* 13, 1351 – 1363

- Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T., Tsukita, S., Tsukita, S.** (1993) The 220-kD Protein Colocalizing with Cadherins in Non-Epithelial Cells Is Identical to ZO-1, a Tight Junction-associated Protein in Epithelial Cells: cDNA Cloning and Immunoelectron Microscopy. *The Journal of Cell Biology* 121, 491 – 502
- Joshi, M., Vargas, C., Boisguerin, P., Diehl, A., Krause, G., Schmieder, P., Moelling, K., Hagen, V., Schade, M., Oschkinat, H.** (2006) Discovery of Low-Molecular-Weight Ligands for the AF6 PDZ Domain. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 3790 – 3795
- Kausalya, P. J., Phua, D. C. Y., Hunziker, W.** (2004) Association of ARVCF with Zonula Occludens (ZO)-1 and ZO-2: Binding to PDZ-Domain Proteins and Cell-Cell Adhesion Regulate Plasma Membrane and Nuclear Localization of ARVCF. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5503 – 5515
- Kawanabe, Y., Yoshida, K., Yanagishima, N.** (1979) Sexual cell agglutination in relation to the formation of zygotes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiology* 20, 423 – 433
- Kigawa, T., Muto, Y., Yokohama, S.** (1995) Cell-free synthesis and amino acid stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. *Journal of Biomolecular NMR* 6, 129 – 134
- Kim, D. M., Choi, C. Y.** (1996) A semicontinuous procaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotech. Prog.* 12, 645 – 649
- Laing, J. G., Chou, B. C., Steinberg, T. H.** (2005) ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells. *Journal of Cell Science* 118, 2167 – 2176
- Laing, J. G., Koval, M., Steinberg, T. H.** (2006) Association with ZO-1 Correlates with Plasma Membrane Partitioning in Truncated Connexin45 Mutants. *The Journal of Membrane Biology* 207, 45 – 53
- Leech, S., Kirk, J., Plumb, J., McQuaid, S.** (2007) Persistent endothelial abnormalities and blood–brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33, 86 – 98
- Leventhal, J. M., Chambliss, G. H.** (1979) DNA-directed cell-free proteinsynthesizing system of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Biophysics Acta* 564, 162 – 171
- Linden, M.** (2004) Rückfaltung und sekretorische Coexpression der Bindedomäne Aga2 des Agglutinin-a aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*. Universität Regensburg
- Linnemann, T., Geyer, M., Jaitner, B. K., Block, C., Kalbitzer, H. R., Wittinghofer, A., Herrmann, C.** (1999) Thermodynamic and Kinetic Characterization of the Interaction between the Ras Binding Domain of AF6 and Members of the Ras Subfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 13556 – 13562

- Lipke, P. N., Hull-Pillsbury, C.** (1984) Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* *tup1* mutants. *Journal of Bacteriology* 159, 797 – 799
- Lipke, P. N., Terrance, K., Wu, Y. S.** (1987) Interaction of α -agglutinin with *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Bacteriology* 169, 483 – 488
- Lipke, P. N., Wojciechowicz, D., Kurjan, J.** (1989) *AGA1* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in Cell-cell interactions during mating. *Molecular Cell Biology* 9, 3155 – 3165
- Lorger, M., Moelling, K.** (2006) Regulation of epithelial wound closure and intercellular adhesion by interaction of AF6 with actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 119, 3385 – 3398
- McGuffin, L. J., Brynson, K., Jones, D. T.** (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404 – 405
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S., Takai, Y.** (1997) Afadin: a novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *Journal of Cell Biology* 139, 517 – 528
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Soppacciaro, 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. *Journal of Cell Biology* 13, 117 – 127
- Matter, K., Balda, M. S.** (2003) Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30, 228 – 234
- Merrick, W. C.** (1983) Translation of exogenous mRNAs in reticulocyte lysates. *Methods of Enzymology* 101, 606 – 615
- Miki, B. L. A., Poon, H. N., James, A. P., Seligy, V. L.** (1982) Possible mechanism for flocculation interactions governed by the gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 150, 878 – 889
- Miyahara, M., Nakanishi, H., Takahashi, K., Satoh-Horikawa, K., Tachibana, K., Takai, Y.** (2000) Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell-contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction. *Journal of Biological Chemistry* 275, 613 – 618
- Miyoshi, J., Takai, Y.** (2005) Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 815 – 855
- Moore, S. A.** (1983) Comparison of dose-response curves for α -factor-induced division arrest, agglutination, and projection formation of yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 258, 13849 – 13856

- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S.** (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 19, 511 – 516
- Müller, S. L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepbergenov, D. I., Huber, O., Blasig, I. E., Krause, G.** (2005) The Tight Junction Protein Occludin and the Adherens Junction Protein α -Catenin Share a Common Interaction Mechanism with ZO-1. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 3747–3756
- Nathans, D., Notani, G., Schwartz, J. H., Zinder, N. D.** (1962) Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by E. coli extracts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 48, 1424-1431
- Nevin, D. E., Pratt, J. M.** (1991) A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Letters* 291, 259 – 263
- Nielsen, P. A., Baruch, A., Shestopalov, V. I., Giepmans, B. N. G., Dunia, I., Benedetti, E. L., Kumar, N. M.** (2003) Lens Connexins α 3Cx46 and α 8Cx50 Interact with Zonula Occludens Protein-1 (ZO-1). *Molecular Biology of the Cell* 14, 2470 – 2481
- Nusrat, A., von Eichel-Streiber, C., Turner, J. R., Verkade, P., Madara, J. L., Parkos, C. A.** (2000) *Clostridium difficile* Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins. *Infection and Immunity* 69, 1329 – 1336
- Nusrat, A., Parkos, C. A., Verkade, P., Foley, C. S., Liang, T. W., Innis-Whitehouse, T., Eastburn, K. K.** (2000) Tight junctions are membrane microdomains. *Journal of Cell Science* 113, 1771 – 1781
- Orlean, P., Ammer, H., Watzele, M., Tanner, W.** (1986) Synthesis of an O-glycosylated cell surface protein induced in yeast by α -factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6263 – 6266
- Osumi, M., Shimoda, C., Yanagishima, N.** (1974) Mating reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. V. Changes in fine structure during the mating reaction. *Archive of Microbiology* 97, 27 – 38
- Pierce, M., Ballou, C. E.** (1983) Cell-cell recognition in yeast. Characterization of the sexual agglutination factors from *Saccharomyces kluyveri*. *Journal of Biological Chemistry* 258, 3576 – 3582
- Polette, M., Gilles, C., Nawrocki-Raby, B., Lohi, J., Hunziker, W., Foidart, J.-M., Birembaut, P.** (2005) Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression Is Regulated by Zonula Occludens-1 in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 65, 7691 – 7698
- Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., Koltun, W. A.** (2007) Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *Journal of Surgical Research* 140, 12 – 19

- Radziwill, G., Erdmann, R. A., Margelisch, U., Moelling, K.** (2003) The Bcr kinase downregulates ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. *Molecular Cell Biology* 23, 4663 – 4672
- Rahner, C., Miltic, L. L., Anderson J. M.** (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localisation of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas and gut. *Gastroenterology* 120, 411 – 422
- Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, B., Baltimore, D.** (1993) Identification of a ten-amino acid proline rich SH3 binding site. *Science* 19, 1157 – 1161
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennet, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C., Friend, S. H.** (2000) *Science* 287, 873 – 880
- Roseman, S.** (1970) The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyl transferase systems and their potential role in intercellular adhesion. *Chemical Physics of Lipids* 5, 270 – 297
- Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D., Lipke, P. N., Kurjan, J.** (1991) The AGA1 gene is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Molecular Cell Biology* 11, 4196 – 4206
- Rubin, L. L., Staddon, J. M.** (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Reviews of Neuroscience* 22, 11 – 28
- Ryeom, S. W., Paul, D., Goodenough, D. A.** (2000) Truncation Mutants of the Tight Junction Protein ZO-1 Disrupt Corneal Epithelial Cell Morphology. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1687 – 1696
- Schneeberger, E. E., Lynch, R. R.** (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 286, 1213 – 1228
- Schumann, F., Riepl, H., Maurer, T., Gronwald, W., Neidig, K.-P., Kalbitzer, H. R.** (2007) Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *Journal of Biomolecular NMR* DOI 10.1007/s10858-007-9197-z
- Shen, Z.-M., Wang, J., Pike, J., Jue, C. K., Zhao, H., de Nobel, H., Kurjan, J., Lipke, P. N.** (2001) Delineation of functional regions within the subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion molecule a-agglutinin. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15768 – 15775
- Shimoda, C., Yanagishima, N.** (1975) Mating reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. VIII. Mating type-specific substances responsible for sexual cell agglutination. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 41, 521 – 532
- Sijmons, P. C., Nederbragt, A. J., Klis, F. M., Van Den Ende, H.** (1987) Isolation and composition of the constitutive agglutinins from haploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Archives of Microbiology* 148, 208 – 212

- Smalley, K. S. M., Brafford, P., Haass, N. K., Brandner, J. M., Brown, E., Herlyn, M.** (2005) Up-Regulated Expression of Zonula Occludens Protein-1 in Human Melanoma Associates with Ncadherin and Contributes to Invasion and Adhesion. *American Journal of Pathology* 16, 1541 – 1554
- Sprague, G. F. Jr., Blair, L. C., Thorner, J.** (1983). Cell interactions and the regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Reviews of Microbiology* 37, 623 – 660
- Steiner, G.** (2001) *Dissertation*. Universität Regensburg
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., Goodenough, D. A.** (1986) Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia. *The Journal of Cell Biology* 103, 755 – 766
- Stevenson, B. R., Keon, B. H.** (1998) The tight junction: morphology to molecules. *Annual Reviews of Cellular Development Biology* 14, 89 – 109
- Takekuni, K., Ikeda, W., Fujito, T., Morimoto, K., Takeuchi, M., Monden, M., Takai, Y.** (2003) Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *Journal of Biological Chemistry* 278, 5497 – 5500
- Taliana, L., Benezra, M., Greenberg, R. S., Masur, S. K., Bernstein, A. M.** (2005) ZO-1: Lamellipodial Localization in a Corneal Fibroblast Wound Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46, 96 – 103
- Taylor, N. W., Orton, L.** (1971) Cooperation among the active binding sites in the sex-specific agglutinin from the yeast *Hansenula wingei*. *Biochemistry* 10, 2043 - 2049
- Terrance, K. P., Heller, P., Wu, Y.-S., Lipke, P. N.** (1987). Identification of glycopeptide components of α -agglutinin, a cell adhesion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 169, 475 – 482
- Terrance, K. P., Lipke, P. N.** (1981) Sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 148, 889 – 896
- Terrance, K. P., Lipke, P. N.** (1987) Pheromone induction of sexual agglutinability of *Saccharomyces cerevisiae* a cells. *Journal of Bacteriology* 169, 4811 – 4815
- Tohoyama, H., Yanagishima, N.** (1982) Control of the production of the sexual agglutination substances by the mating type locus in agglutinin: simultaneous expression of specific genes for α and α agglutination substances in *mat α 2* mutant cells. *Mol. Gen. Genet.* 186, 322 – 327
- Tsukita, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S.** (1993) Submembranous Junctional Plaque Proteins Include Potential Tumor Suppressor Molecules. *The Journal of Cell Biology* 123, 1049 – 1053

- Uehara, K., Uehara, A.** (2008) Localization of claudin-5 and ZO-1 in rat spleen sinus endothelial cells. *Histochemical Cellular Biology* 129, 95 – 103
- Utepbergenov, D. I., Fanning, A. S., Anderson, J. M.** (2006) Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24671 – 24677
- Van Meer, G., Simons, K.** (1986) The function of Tight Junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO Journal* 5, 1455 – 1464
- Wagner, N., Lipke, P. N.** (1983) Properties of a-agglutinin from *Saccharomyces cerevisiae*, p.175. Abstr. 83rd Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Watzel, M., Klis, F., Tanner, W.** (1988) Purification and characterization of the inducible a-agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 7, 1483 – 1488
- Wickerham, L. J.** (1956) Influence of agglutination on zygote formation in *Hansenula wingei*, a new species of yeast. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiology* 26, 423 – 443
- Wickerham, L. J.** (1958) Sexual agglutination of heterothallic yeasts in diverse taxonomic areas. *Science* 128, 1504 – 1505
- Willott, E., Balda, M. S., Fanning, A. S., Jameson, B., van Itallie, C., Anderson, J. M.** (1993) The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc. Natl. Acad. Science* 90, 7834 – 7838
- Wohlgemuth, S., Kiel, C., Krämer, A., Serrano, L., Wittinghofer, F., Herrmann, C.** (2005) Recognizing and Defining True Ras Binding Domains I: Biochemical Analysis. *Journal of Molecular Biology* 348, 741 – 758
- Woods, D. F., Bryant, J. P.** (1993) ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech Development* 44, 85 – 89
- Wu, J., Yang, Y., Zhang, J., Ji, P., Du, W., Jiang, P., Xie, D., Huang, H., Wu, M., Zhang, G., Wu, J., Shi, Y.** (2007) Domain-Swapped Dimerization of the Second PDZ Domain of ZO2 may Provide a Structural Basis for the Polymerization of Claudins. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35988 – 35999
- Yamaguchi, M., Yoshida, K., Yanagishima, N.** (1984) Isolation and chemical biological characterization of an a-mating-type-specific glycoprotein responsible for sexual agglutination from the cytoplasm of a cells in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 140, 113 – 119
- Yanagishima, N., Yoshida, K.** (1981) Sexual interactions in *Saccharomyces cerevisiae* with special reference to regulation of sexual agglutinability. *Academic Press, Inc., New York* 261 – 295

- Yamamoto, T., Harada, N., Kano, K., Taya, S., Canaani, E., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Ide, C., Kaibuchi, K.** (1997) The Ras Target AF-6 Interacts with ZO-1 and Serves as a Peripheral Component of Tight Junctions in Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology* 139, 785 – 795
- Yamamoto, T., Harada, N., Kawano, Y., Taya, S., Kaibuchi, K.** (1999) *In Vivo* Interaction of AF-6 with Activated Ras and ZO-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 103 – 107
- Yoshida, K., Hagiya, M., Yanagishima, N.** (1976). Isolation and purification of the sexual agglutination substance of mating type a cells in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Biophysical Research Community* 71, 1085 – 1094
- Zhadanov, A. B., Provance, D. W. Jr., Speer, C. A., Coffin, J. D., Goss, D., Blixt, J. A., Reichert, C. M., Mercer, J. A.** (1999) Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell–cell junctions and cell polarity during mouse development. *Current Biology* 9, 880 – 888
- Zhang, Z., Rehmann, H., Price, L. S., Riedl, J., Bos, J. L.** (2005) AF6 Negatively Regulates Rap1-induced Cell Adhesion. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 33200 – 33205
- Zheng, B., Cantley, L. C.** (2007) Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *PNAS* 104, 819 – 822

7 Anhang

Sequenzen der Expressionskonstrukte

AF6(1-141)

MSAGGRDEER RKLADIHHW NANRLDLFEI SQPTEDLEFH GVMRFYFQDK AAGNFATKCI RVSSTATQD
 VIETLAEKFR PDMRMLSSPK YSLYEVHVSG ERRLDIDEKP LVVQLNWNKD DREGRFVLKN ENDAIPAKKA
 Q

AF6(36-206)

DLEFHGVMRF YFQDKAAGNF ATKCIRVSST ATTQDVIETL AEKFRPDMMR LSSPKYSLYE VHVSGERRLD
 IDEKPLVVQL NWNKDDREGR FVLKNENDAI PPKAQSNQPE KQEKEGVION FKRTLSKKEK KEKKKREKEA
 LRQASDKDDR PFQGEDVENS RLAAEVYKDM P

ZO1-k

MSARAAAAKS TAMEETAIWE QHTVTILHRAP GFGFGIAISG GRDNPHFQSG ETSIVISDVL KGGPAEGQLQ
 ENDRVAMVNG VSM DNVEHAF AVQQLRKSGK NAKITIRKK KVQIPVSHPD PDPVSDNEDD SYDEVDHDP
 SGRGALANRR GEKSWARDS ASRDRSLSPR SDRRSVASSQ PAKPTKVTLV KSRKNEEYGL RLASHIFVKE
 ISQDSLAAARD GNIQEGDVVL KINGTVTENM SLTDAKTIE RSKGKLKMVV QORDERATLLN VPDLSDSIHS
 ANASERDDIS EIQLASDHS VRSHDRPPRR SQSRSPDQRS EPSDHSTQSP QQPSNGSLRS REEERMSKPG
 AVSTPVKHVD DHTPKAVEEV TVEKHEKQTP TLPEPKPVYA QVGQPDVDLP VSPSDGVLPN STHEDGILRP
 SMKLVKFRKG DSVGLRLAGG NDVGIFVAGV LEDSPAAGEG LEEGDQILRV NNVDFTNIIR EEAVLFLDL
 PKGEEVTILA QKKKDVYRRI VESDVGDSFY IRTHFYEKE SPYGLSFNKG EVFRVVDTLY NGKLGSLAI
 RIGKNHKEVE RGIVPNKNRA EQLASVQYTL PKTAGGDRAD FWRFRGLRSS KRNLRKSRED LSAQPVQTKF
 PAYERVVLRE AGFLRPVTIF GPIADVAREK LAREEPDIYQ IAKSEPRDAG TDRSSGIIR LHTIKQIIDQ
 DKHALLDVTP NAVDRLNYAQ WYPIVFLNP DSKQGVKTMRL MRLCPESRKS ARKLYERSHK LRKNHHFLT
 TTINLNSMND GWYGALKEAI QQQQNQLVWV SEGKADGATS DDLDLHDDR SYLSAPGSEY SMYSTDSRHT
 SDYEDTDTEG GAYTDQELDE TL

ZO1-P2P3

KVTLVKSRKN EEYGLRLASH IFVKEISQDS LAARDGNIQE GDVVLKINGT VTENMSLTDA KTLIERSKGG
 LKMVVQORDER ATLLNVPDLS DSIHSANASE RDDISEIQSL ASDHSVRSHD RPPRRSQSRS PDQRSEPSDH
 STQSPQQPSN GSLRSREEER MSKPGAVSTP VKHVDDHTPK AVEEVTVEKH EKQTPTLPEP KPVYAQVGQP
 DVDLPVSPSD GVLPNSTHED GILRPSMKLV KFRKGDSVGL RLAGGNDVGI FVAGVLEDSP AAKEGLEEGD
 QILRVNNVDF TNIIREEAVL FLDDLPGKEE VTILAQK

ZO1-P3

SMKLVKFRKG DSVGLRLAGG NDVGIFVAGV LEDSPAAGEG LEEGDQILRV NNVDFTNIIR EEAVLFLDL
 PKGEEVTILA QK

ZO1-P2⁺

KVTLVKSRKN EEYGLRLASH IFVKEISQDS LAARDGNIQE GDVVLKINGT VTENMSLTDA KTLIERSKGG
 LKMVVQORDER ATLLNVPDLS DSIHSANASE RDDISEIQSL ASDHSVRSHD RPPRRSQSRS PDQRSEPSDH

STQSPQQPSN GSLRSREEER MSKPGAVSTP VKHVDHTPK AVEEVTVEKH EKQTPTLPEP KPVYAQVGQP
 DVDLPVSPSD GVLPNSTHED GILRP

Vergleich der Sequenzen von Aga2 und Aga2-FSS:

Aga2: **M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M R** E L T T I **C** E
 FSS: **M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M R** E L T T I **S** E

Q I P S P T L E S T P Y S L S T T T I L A N G K A M Q G V F E
 Q I P S P T L E S T P Y S L S T T T I L A N G K A M Q G V F E

Y Y K S V T F V S N **C** G S H P S T T S K G S P I N T Q Y V F
F Y K S V T F V S N **S** G S H P S T T S K G S P I N T Q Y V F

*Vergleich der Sequenzen der Konstrukte Aga2 (oben) und der Mutante Aga2-FSS (unten).
 Der His-Tag zusammen mit der Thrombin-Erkennungssequenz ist grün hinterlegt, die bei
 FSS mutierten Aminosäuren sind rot markiert.*

Sequenz von His-Aga1: MW = 18,4 kDa

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M L E D P M T L S F A H
 F T Y L F T I L L G L T N I A L A S D P E T I L V T I T K T N
 D A N G V V T T T V S P A L V S T S T I V Q A G T T T L Y T T
 W C P L T V S T S S A A E I S P S I S Y A T T L S R F S T L T
 L S T E V C S H E A C P S S S T L P T T T L S V T S K F T S Y
 I C P T C H T T A I S S L S E V G T S

*Sequenz von His-Aga1 in pET14b. Der His-Tag zusammen mit der Thrombin-
 Erkennungssequenz ist grün hinterlegt, der Rest entspricht der Sequenz von Aga1.*

Sequenzielle Zuordnung von AF6(1-141)

Residue		Shifts	
		HN	N
4	GLY	8,45	109,00
5	GLY	8,32	110,06
6	ARG	8,47	122,32
7	ASP	8,36	120,37
8	GLU	8,10	121,31

9	GLU	8,08	120,92
10	ARG	8,47	121,23
11	ARG	7,97	119,74
13	LEU	7,84	121,81
14	ALA	8,80	122,24
15	ASP	7,85	119,43
16	ILE	7,78	123,38
17	ILE	8,40	123,85
18	HIS	8,67	120,92
19	HIS	8,11	118,65
20	TRP	8,50	124,35
21	ASN	9,14	117,17
24	ARG	7,11	118,96
25	LEU	8,26	119,43
26	ASP	8,20	122,56
31	SER	9,14	125,84
32	GLN	7,90	114,90
34	THR	8,98	114,12
35	GLU	9,34	121,07
36	ASP	7,61	116,23
37	LEU	8,14	114,94
38	GLU	7,35	119,67
39	PHE	7,88	119,31
40	HIS	8,47	115,72
41	GLY	8,55	107,01
42	VAL	9,01	124,94
43	MET	8,90	127,87
44	ARG	8,60	123,61
45	PHE	8,84	123,49
46	TYR	8,83	121,85
47	PHE	9,05	122,32
48	GLN	7,87	128,10
49	ASP	8,10	127,05
50	LYS	8,45	123,65
51	ALA	8,25	123,22
53	GLY	8,04	108,06
55	PHE	8,51	120,02
56	ALA	8,75	127,01
57	THR	8,47	111,31
58	LYS	8,60	122,32
59	CYS	8,64	121,50

60	ILE	8,55	117,56
61	ARG	8,65	125,10
62	VAL	8,82	131,31
63	SER	7,96	119,24
64	SER	9,01	122,20
65	THR	7,65	110,10
66	ALA	7,29	127,32
67	THR	8,86	113,77
68	THR	8,75	119,82
70	ASP	7,44	120,56
71	VAL	8,24	121,35
72	ILE	8,63	121,31
74	THR	7,69	117,36
75	LEU	8,48	122,13
76	ALA	8,74	122,13
77	GLU	7,01	115,76
78	LYS	7,63	117,79
79	PHE	8,17	116,50
80	ARG	7,46	121,27
82	ASP	8,17	117,87
84	ARG	8,24	121,50
85	MET	8,30	120,45
86	LEU	8,20	123,18
87	SER	7,97	115,68
90	LYS	7,73	123,14
91	TYR	8,41	123,45
92	SER	9,03	116,42
93	LEU	9,45	126,38
94	TYR	9,55	125,13
95	GLU	9,01	119,86
96	VAL	9,16	126,19
97	HIS	8,50	126,50
99	SER	7,63	110,84
100	GLY	7,35	110,80
101	GLU	8,46	117,52
102	ARG	8,97	122,71
103	ARG	8,85	130,64
104	LEU	9,03	132,09
105	ASP	9,63	123,38
106	ILE	8,56	119,86
107	ASP	8,30	117,20

108	GLU	7,31	120,33
109	LYS	8,67	121,15
111	LEU	8,80	116,93
112	VAL	6,82	118,85
113	VAL	7,76	121,74
114	GLN	7,37	117,79
117	TRP	7,71	124,39
124	GLY	7,24	108,96
125	ARG	7,89	116,58
126	PHE	9,09	120,68
127	VAL	9,32	124,31
128	LEU	9,52	131,85
129	LYS	9,31	124,55
130	ASN	8,94	120,64
131	GLU	8,90	126,31
132	ASN	8,06	118,81
133	ASP	7,96	121,46
134	ALA	7,89	124,51
135	ILE	8,07	122,91
137	ALA	8,32	125,53
138	LYS	8,25	121,97
139	LYS	8,39	124,24
141	GLN	7,90	125,41

Danksagung

Bei allen Personen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken. Dieser Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die interessante und vielschichtige Themenstellung, die Bereitstellung eines exzellent ausgestatteten Arbeitsplatzes und sein Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Gudrun Horn für ihr stets offenes Ohr für sämtliche Probleme des Laboralltags, ihre überaus hilfreichen Ratschläge und die sehr nette Stimmung im Labor. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenso bei Emmi Fuchs bedanken, die neben ihrer organisatorischen Tätigkeit maßgeblich am guten Laborklima beteiligt ist. Bei Emmi möchte ich mich außerdem herzlichst für ihre großen Hilfe bei der Präparation meiner Proteine bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Christian Hermann für die Bereitstellung der AF6-Klone und Prof. Dr. Widmar Tanner für die Überlassung des Aga2-Konstrukts sowie des entsprechenden Antikörpers. Prof. Dr. Kozo Kaibuchi und Prof. Dr. Goodenough danke ich für die prompte Übersendung ihrer ZO-1-Konstrukte.

Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich für die Nutzung des CD-Spektrometers.

Bei PD Dr. Wolfram Gronwald bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung.

Für die Hilfe bei der Anfertigung der NMR-Spektren möchte ich Dr. Frank Schumann und Dr. Norman Kachel danken. Für die Hilfestellung bei der Auswertung der Spektren möchte ich mich außerdem bei Dr. Konrad Brunner und Kumaran Baskaran bedanken.

Allen übrigen Mitgliedern des Lehrstuhls danke ich für die schöne Zeit und die wunderbare Atmosphäre.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Frau Tanja und meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, April 2008

Gerald Bäuml