

# Charakterisierung der Struktur, Funktion und Wechselwirkungen der *Tight Junction* Proteine Occludin und Zonula Occludens 1

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biochemikerin Juliane Katharina Walter

geboren am 09.12.1978 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann  
2. PD Dr. Ingolf E. Blasig  
3. Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2009

## Abstract

Tight junctions restrict diffusion through the paracellular gap in endothelia and epithelia. Thereby they constrain the uptake of water soluble drugs to the tissue. Zonula occludens protein 1 (ZO-1) and occludin are some of proteins involved in tight junction assembly. The opening of tight junctions is a possibility to apply drugs. Therefore the structure, function and regulation of ZO-1 and occludin is characterised.

In previous studies, a model predicted the interaction of occludin and ZO-1 through helices. It was proposed that the interaction is mediated by oligomers of ZO-1 and Occludin. This author's experimental research supports these hypotheses. Furthermore, occludin is shown to self assemble via disulfide bridges. This interaction could be of importance during stroke and ischemia. Both diseases cause the opening of tight junctions in combination with oxidative stress.

In addition, this author investigated the interaction and regulation of the PDZ domains of ZO-1. It was shown that the PDZ domains are phosphorylated by protein kinase C alpha and interact with protein phosphatases 2A and 4. Phosphorylation led to a reduction in affinity of PDZ to membrane proteins in vitro.

This thesis contributes to the understanding of the mechanisms which are involved in the sealing of the paracellular gap.

tight junction, zonula occludens protein 1, occludin, PDZ, oxidative stress

## Kurzübersicht

Die tight junction schränken die Diffusion durch den parazellulären Raum in Epithel- und Endothelzellschichten für viele Moleküle stark ein. Dadurch behindern sie die Aufnahme von wasserlöslichen Medikamenten in das dahinterliegende Gewebe. Zwei Proteine, die am tight junction Aufbau mitwirken, sind Zonula Occludens Protein 1 (ZO-1) und Occludin. Eine Öffnung der tight junction stellt eine Möglichkeit für die Verabreichung von Medikamenten dar. Deshalb wurden die tight junction Proteine ZO-1 und Occludin auf ihre Funktion, Struktur und Regulation untersucht.

Für die Interaktion beider Proteine gab es ein Modell, welches eine Oligomerisierung der Bindungspartner als Voraussetzung ihrer Interaktion über helikale Wechselwirkungen vorhersagte. Die Annahmen aus dem Modell der Interaktion von ZO-1 und Occludin konnten experimentell bestätigt werden. Für den C-Terminus von Occludin wurde darüber hinaus eine Interaktion über Disulfidbrücken nachgewiesen. Diese Interaktion könnte in der Zelle von pathologischer Bedeutung bei Schlaganfall und Ischämie sein. Beide Erkrankungen verursachen eine Öffnung der tight junction im Zusammenhang mit oxidativem Stress.

ZO-1 bindet über PDZ Domänen eine Vielzahl von tight junction Proteinen, die an der Abdichtung des parazellulären Raums beteiligt sind. Deshalb wurde die Interaktion und Regulation der PDZ-Domänen aus ZO-1 untersucht. Eine Phosphorylierung der PDZ durch die Proteinkinase C alpha sowie eine Interaktion mit den Phosphatasen 2A und 4 konnte nachgewiesen werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der PDZ-Domänen die Bindung an Membranproteine der tight junction beeinflusst.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag, die Mechanismen, die zum Verschluss des parazellulären Spaltes führen, aufzuklären. Damit zeigt sie Ansatzpunkte für eine pharmakologische Beeinflussung der Permeabilität der tight junction auf.

tight junction, Zonula Occludens Protein 1, Occludin, PDZ, oxidativer Stress

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	8
1.1 Zellkontakte in Epithel- und Endothelzellen.....	8
1.2 Die Blut-Hirn-Schranke.....	10
1.3 Die Proteine des <i>tight junction</i> -Komplexes.....	10
1.3.1 <i>Junctional adhesion</i> Moleküle.....	10
1.3.2 Tetraspannproteine.....	11
1.3.2.1 Occludin.....	11
1.3.2.2 Claudine.....	13
1.3.2.3 Tricellulin.....	13
1.3.3 Zonula Occludens-Proteine.....	14
1.3.3.1 Zonula Occludens-Protein-1.....	14
1.3.3.2 Zonula Occludens-Protein-2.....	14
1.3.3.3 Zonula Occludens-Protein-3.....	14
1.3.4 Funktion der Zonula Occludens-Proteine in der Zellkontaktbildung.....	15
1.3.5 Die proteinbindenden Domänen von Zonula Occludens-Protein-1.....	16
1.3.5.1 PDZ-Domänen.....	17
1.3.5.2 SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit.....	19
1.3.6 Verbindung von Zonula Occludens Proteinen zum Zytoskelett.....	20
1.4 Zonula Occludens Proteine und die Signaltransduktion an den <i>tight junction</i> .....	21
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie.....	29
2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	29
2.2.1.2 Sequenzierung.....	29
2.2.1.3 Transfektion in <i>Escherichia Coli</i> .....	30
2.2.1.4 Anlegen von Minikulturen.....	30
2.2.1.5 Lagerung der Stämme.....	30
2.2.2 Erzeugung der Deletionsmutanten von Zonula Occludens-1.....	30
2.2.3 Ortsspezifische Mutagenese.....	32
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.3.1 Standardmethoden der Proteinbiochemie.....	34
2.3.2 Bakterielle Expression.....	34
2.3.2.1 Testexpressionen.....	34
2.3.3 Zellaufschluß.....	34
2.3.3.1 mit Ultraschall.....	34
2.3.3.2 mit Druck.....	34
2.3.4 Affinitätschromatographische Reinigung der Proteine.....	35
2.3.4.1 Glutathion-S-Transferase- Fusionen.....	35
2.3.4.2 Maltosebindeprotein-Fusionen.....	35
2.3.4.3 Histidin-tag.....	35
2.3.4.4 Strep-Tag II-tag.....	35



2.3.5	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.3.6	<i>Immuno</i> -Blot (Western-Blot).....	36
2.3.7	Peptidbibliothekbindungsanalyse.....	36
2.3.8	Proteinbindungsanalyse aus einem Zelllysate ( <i>pull-down</i> -Experiment).....	37
2.3.9	Protein-Färbung.....	37
2.3.9.1	Schnelle Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	37
2.3.9.2	Coomassie-Blau-Färbung für anschließende Massenspektrometrie.....	37
2.3.9.3	Silberfärbung.....	38
2.3.10	Maskierung der Cysteine der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin.....	38
2.3.11	<i>In vitro</i> Phosphorylierung.....	38
2.3.12	Größenausschlusschromatografie (SEC).....	38
2.3.13	Oberflächenplasmonresonanz- (SPR) Spektroskopie.....	39
2.3.14	Circulardichroismus-(CD) Spektroskopie.....	41
2.3.15	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).....	42
2.3.16	Lichtstreuung.....	42
2.3.17	Massenspektrometrie.....	43
2.3.17.1	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Messung.....	43
2.3.17.2	Präparation der Proteine für die Massenspektrometrie.....	43
2.3.17.3	Flüssigchromatografie-Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (Nano-LC-ESI-MS/MS).....	44
2.3.18	Identifizierung von Proteinen aus der Massenspektrometrie.....	44
2.3.19	Quantifizierung von Proteinen aus der Massenspektrometrie.....	45
2.3.20	Bestimmung des Markierungsgrades.....	45
2.3.21	Bestimmung des Mischungsverhältnisses der Zelllysate.....	45
2.3.22	Identifizierung von Phosphorylierungsstellen mit Massenspektrometrie.....	46
2.4	Zellkulturtechniken.....	46
2.4.1	Kultivierung und metabolische Markierung von Rattenepithelzellen.....	46
2.4.2	Kultivierung von humanen embryonalen Nierenepithelzellen.....	47
2.4.3	Transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenepithelzellen.....	47
2.4.4	Interaktionsmessungen in lebenden Zellen.....	47
2.5	Statistik.....	48
2.6	Programme.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Die PDZ-Domänen von Zonula Occludens 1.....	49
3.1.1	Die PDZ-Domänen 1 und 2 wurden rekombinant aus <i>Escherichia coli</i> gereinigt.....	49
3.1.2	Die PDZ 2-Domäne liegt <i>in vitro</i> als Dimer vor – die PDZ 1-Domäne hingegen als Monomer.....	49
3.1.3	Die Struktur der PDZ 2-Domäne.....	51
3.1.3.1	Untersuchung der Dimerisierung der PDZ 2 H209G Mutante mittels Größenausschlusschromatografie.....	51
3.1.3.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zeigt: die PDZ 2 H209G Mutante bildet Dimere in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293-Zellen).....	51
3.1.4	In Peptidbibliotheken wurden neue Bindungspartner der ZO-1 PDZ-Domänen identifiziert....	54
3.1.5	Identifizierung von Bindungspartnern der PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 aus Epithelzellen mit ESI MS/MS.....	66
3.1.6	Elf Proteine konnten in der Peptidbibliothek und in Rattenepithelzellen als Bindungspartner der PDZ-Domänen identifiziert werden.....	67
3.1.7	Einfluss der Serin/Threonin Phosphorylierung auf die Bindungseigenschaften der PDZ-Domänen.....	68
3.1.7.1	<i>In vitro</i> Phosphorylierung der PDZ-Domänen durch Proteinkinase C Isoformen.....	69
3.1.7.2	Phosphorylierungsstellen der Protein Kinase C alpha in PDZ 1 und PDZ 2.....	70
3.1.7.3	PDZ-Domänen mit vorgetäuschter Phosphorylierung verhalten sich wie der Wildtyp in der Größenausschlusschromatografie.....	73
3.1.7.4	Bindungseigenschaften von PDZ-Domänen mit vorgetäuschter Phosphorylierung.....	73
3.2	Selbstassoziation der SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit von ZO-1.....	75

3.2.1	Darstellung von ZO-1 Deletionsmutanten.....	75
3.2.2	Die ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit und Verkürzungen interagieren mit sich selbst in der Oberflächenresonanz Spektroskopie.....	76
3.2.3	Die SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit und ihre einzelnen Domänen zeigen große Oligomere in der Größenausschlusschromatografie.....	77
3.2.4	Dynamische Lichtstreuung an ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK Deletionsmutanten bestätigen die Oligomerisierung.....	77
3.3	Die C-terminale <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin interagiert mit sich selbst .....	80
3.3.1	Identifizierung von Oligomeren der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin mit SDS-Gelelektrophorese und <i>Immuno-Blotting</i> .....	80
3.3.2	Abhängigkeit der Oligomerisierung der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin von der Konzentration eines Reduktionsmittels.....	81
3.3.3	Chemische Modifizierung der Cysteine in der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin.....	82
3.3.4	Die C-terminale <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin zeigt eine $\alpha$ -helikale Struktur in der Circular dichroismus-Spektroskopie .....	82
3.3.5	Die Selbstinteraktion der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin ist abhängig vom Redoxzustand der Cysteine: Analyse mit Größenausschlusschromatografie.....	83
3.3.6	Occludin Monomer und Dimer zeigen eine elongierte Molekülform in der Lichtstreuung .....	85
3.3.7	Die Selbstinteraktion der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin wurde mit Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)-Untersuchungen bestätigt .....	86
3.4	Interaktion von Peptiden aus ZO-1 mit dem C-Terminus von Occludin .....	88
3.4.1	Der Occ C bindet an Peptide aus der SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit von ZO-1 im Oberflächenplasmonresonanz-Experiment .....	88
3.4.2	Stabilität des Komplexes aus ZO-1-Peptiden mit dem C-Terminus von Occludin .....	89
3.4.3	Occludin C Titration mit Peptiden von ZO-1 zeigt keine Enthalpieänderung.....	92
3.4.4	Kristallisation.....	92
4	Diskussion .....	93
4.1	Die PDZ-Domänen von ZO-1.....	93
4.1.1	Regulation der Interaktion von PDZ-Domänen aus ZO-1 an die C-Termini von Membranproteinen.....	96
4.1.2	Selbstinteraktion der PDZ 2-Domäne in lebenden Zellen.....	99
4.2	Die Oligomere der SH3-h-GuK-Einheit.....	100
4.3	Selbstinteraktion von Occludin.....	101
4.3.1	Physiologische Bedeutung der Dimerisierung von Occludin .....	102
5	Zusammenfassung.....	104
6	Summary .....	106
7	Literaturverzeichnis .....	108
8	Danksagung .....	119
9	Lebenslauf wurde entfernt.....	120
10	Publikationsliste .....	121
11	Erklärung .....	122
12	Anhang PDZ-Domänen von ZO-1.....	123
12.1	Elutionsfraktionen des <i>pull-down</i> Experiments aus Rattenepithelzellen .....	123
12.2	Größenausschlusschromatogramm der PDZ 2 Mutante .....	123
12.3	Expression und Reinigung der PDZ-Domänen 1 und 2 aus ZO-1.....	124
12.4	Klonierung und Expression der PDZ 3 aus ZO-1 .....	124
13	Anhang Occludin.....	125
14	Anhang <i>pull-down</i> -Experiment PDZ 2.....	126
15	Anhang <i>pull-down</i> -Experiment von PDZ 1.....	138

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von Epithelzellen mit verschiedenen Zellkontakten und deren Funktionen für die Zelle.....	8
Abb. 2: Die <i>tight junctions</i> stellen eine Verbindung zwischen zwei benachbarten Zellen her.....	9
Abb. 3: Schematische Abbildung von Occludin.....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Ligandenbindung an die PDZ 1-Domäne.....	17
Abb. 5: Strukturen der PDZ 1 und PDZ 2-Domäne von Zonula Occludens -1.....	18
Abb. 6: Interaktionsmodell der Dimere der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin und der SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit aus ZO-1.....	20
Abb. 7: Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie.....	39
Abb. 8: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Analyt und Ligand in einem Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Sensorgramm.....	40
Abb. 9: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuungsmessung.....	42
Abb. 10: Massenspektren und Polyacrylamidgele von ZO-1 PDZ 1 und 2-Domäne.....	49
Abb. 11: Größenausschlusschromatografie der PDZ-Domänen von ZO-1.....	50
Abb. 12: Expression von CFP und YFP fusionierten PDZ 2-Domänen und der Mutante PDZ 2 H209G in HEK 293-Zellen.....	52
Abb. 13: Expression von PDZ 2 CFP und der Mutante PDZ 2 H209G YFP sowie CFP und YFP Kontrollen in HEK 293-Zellen.....	53
Abb. 14: Bindungspartner der PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 identifiziert in einer Peptidbibliothek aus 51 Peptiden.....	56
Abb. 15: Bindungspartner von ZO-1 PDZ 1 in einer Peptidbibliothek mit 6322 C-terminalen Peptiden von humanen Proteinen.....	57
Abb. 16: Bindungspartner von ZO-1 PDZ 2 in der 6322 C-Termini umfassenden humanen Peptidbibliothek.....	61
Abb. 17: Reinigung von PDZ assoziierten Proteinkomplexen aus Rattenepithelzellen.....	67
Abb. 18: Die PDZ 1 und PDZ 2-Domänen werden <i>in vitro</i> durch Proteinkinase C Isoenzyme phosphoryliert.....	70
Abb. 19: Massenspektrum des Phosphopeptids I <sub>(phos)</sub> TIR aus der PDZ 1-Domäne.....	71
Abb. 20: Defragmentierung im MS/MS Spektrum beweist die Phosphorylierung von Thr109 in PDZ 1 ...	71
Abb. 21: Massenspektrum des Phosphopeptids LA <sub>(phos)</sub> SHIFVK aus der PDZ 2-Domäne.....	72
Abb. 22: MS/MS Spektrum beweist die Phosphorylierung von Ser 208 in PDZ 2.....	72
Abb. 23: Die PDZ-Domänen mit Mutation verhalten sich in der Größenausschlusschromatografie und	

dem Polyacrylamidgel wie die PDZ-Domänen.....	73
Abb. 24: Austausch von Threonin gegen Glutamat in den PDZ-Domänen von ZO-1 hat eine Auswirkung auf die Ligandenbindung der PDZ-Domänen.....	74
Abb. 25: Die Domänen der ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit in der SDS-Gelelektrophorese .....	75
Abb. 26: Die ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit und die ZO-1 <i>hinge</i> -GuK-Einheit zeigen eine konzentrationsabhängige Interaktion im Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Experiment.....	76
Abb. 27: Die Chromatogramme der ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK II-Einheit und ihrer Verkürzungen zeigen Oligomere .....	77
Abb. 28: Lichtstreuungsuntersuchungen zeigen, die MBP-ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK II Einheit und ihre Verkürzungen bilden Oligomere.....	78
Abb. 29: Zeitabhängige Bildung der MBP-ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK I Oligomere in der Lichtstreuung.....	79
Abb. 30: Nachweis der Oligomerisierung der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin mit SDS-Gelelektrophorese (A) und mit <i>Immuno</i> -Blot (B) .....	80
Abb. 31: Redoxtitration der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin .....	81
Abb. 32: Position der Cysteine in der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin .....	82
Abb. 33: CD-Spektrum der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin mit und ohne blockierte Cysteine.....	83
Abb. 34: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen .....	84
Abb. 35: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin mit und ohne blockierte Cysteine .....	85
Abb. 36: Selbstinteraktion der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin in Abhängigkeit von verschiedenen Affinitätsanhängen im SPR-Experiment .....	87
Abb. 37: Interaktion zwischen der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin und Peptiden aus der ZO-1 SH3- <i>hinge</i> -GuK-Einheit im Oberflächenplasmonresonanz-Experiment .....	88
Abb. 38: Größenausschlusschromatografie des Occludin C nach Inkubation mit Peptiden aus ZO-1.....	89
Abb. 39: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin mit biotinylierten Peptiden aus ZO-1 .....	90
Abb. 40: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin inkubiert mit biotinylierten Peptiden aus ZO-1 und Nachweis der Peptide im <i>Immuno</i> -Blot.....	91
Abb. 41: Position der mutierten Aminosäuren in den PDZ-Domänen 1 und 2 von Zonula Occludens 1... 98	
Abb. 42: Kristallstruktur der C-terminalen <i>coiled-coil</i> -Domäne von Occludin .....	102

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Phentypen hervorgerufen durch Deletion oder Unterdrückung der Expression von Zonula Occludens Proteinen .....	16
Tab. 2: Bindungspartner der PDZ-Domänen von Zonula Occludens 1 .....	19
Tab. 3: Die ZO-Proteine und ihre Interaktion mit Proteinen aus der Signaltransduktion und Zellproliferation.....	22
Tab. 4: Chemikalien.....	24
Tab. 5: Zusammenstellung der Enzyme und Kits .....	25
Tab. 6: Materialien und Geräte.....	25
Tab. 7: Antikörper .....	27
Tab. 8: Bakterienstämme und eukaryotische Zellkulturen .....	27
Tab. 9: Plasmide und Proteinsequenzen von Occludin und Zonula Occludens -1 (ZO-1) .....	28
Tab. 10: Petide von ZO-1 .....	28
Tab. 11: Sequenzierprimer für Zonula Occludens-1 .....	29
Tab. 12: Plasmide und Antibiotikaresistenzen .....	30
Tab. 13: PCR Programm für die Amplifikation der Zonula Occludens-1 Abschnitte.....	30
Tab. 14: Oligonukleotide für die Erzeugung neuer Zonula Occludens-1 Fragmente.....	31
Tab. 15: Zusammensetzung des Mutageneseansatzes .....	32
Tab. 16: Polymerasekettenreaktionsprogramm für die ortsspezifische Mutagenese .....	33
Tab. 17: Oligonukleotide zur Mutagenese der PDZ 1 und 2-Domäne .....	33
Tab. 18: Eigenschaften von Occludin C Fusionsproteinen und MBP aus den Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Untersuchungen.....	41
Tab. 19: Puffer für die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie .....	41
Tab. 20: Parameter mit denen die Peptide im Programm MASCOT Proteinen aus der Swissprot Datenbank zugeordnet wurden. ....	44
Tab. 21: Zellkulturbestandteile für die Kultivierung von Epithelzellen.....	46
Tab. 22: Lichtstreuungsuntersuchungen der PDZ-Domänen.....	50
Tab. 23: Selbstinteraktion der PDZ 2-Domäne und der Mutante PDZ 2 H209G in humanen embryonalen Nierenzellen.....	54
Tab. 24: Bindungspartner der PDZ-Domänen 1 und 2 in einer 51 Peptide umfassenden Peptidbibliothek aus Zellkontaktproteinen und multidrug resistance Proteinen. ....	55
Tab. 25: Zusammenstellung der 86 Bindungspartner von ZO-1 PDZ 1.....	58

Tab. 26: Zusammenstellung der Bindungspartner von ZO-1 PDZ 2.....	63
Tab. 27: Proteine, die sowohl in den Peptidbibliotheken als auch den Rattenepithelzellen als Bindungspartner der PDZ-Domänen identifiziert wurden.....	68
Tab. 28: Potenzielle Phosphorylierungsstellen in PDZ 1 und 2 und dazugehörige Kinasen, identifiziert durch NetPhosK .....	69
Tab. 29: Phosphorylierungsvorhersage aufgrund von Sequenzhomologien zu phosphorylierten Peptiden für ZO-1 PDZ 1 und PDZ 2 mit NetPhos 2.0.....	69
Tab. 30: Die C-terminale coiled-coil-Domäne von Occludin mit blockierten Cysteinen zeigt einen kleineren hydrodynamischen Radius in der Lichtstreuung als die unblockierte Domäne.....	86
Tab. 31: Konsensussequenz für Liganden der PDZ 1-Domäne aus ZO-1 und C-terminale Sequenzen von ZO-1 PDZ 1 bindenden Proteinen.....	93
Tab. 32: Konsensussequenzen der PKC $\alpha$ und $\eta$ im Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der phosphorylierten Aminosäuren der PDZ 1 Thr109 und PDZ 2 Ser208.....	97

## Abkürzungsverzeichnis

AF-6	ALL-1 Fusionspartner auf Chromosom 6
AJ	Adherens junction
AMP	Adenosinmonophosphat
aPKC	Atypische PKC
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ARVCF	Armadillo-repeat gene deleted in Velo-cardio-facial syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLU	Böhringer Light Units
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
C-	Carboxy-
CACO	carcinoma of colon cells, Darm-Karzinom Zellen
CAR	Coxsackie und Adenovirus Rezeptor
cc1	<i>coiled-coil 1</i>
CD	Circulardichroismus-Spektroskopie
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
Cld	Claudin
cPKC	Konventionelle PKC
CRF	Kortikotropin- <i>releasing</i> -Hormon
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-face	Extrazelluläre Hälfte
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
F9	embryonale Teratocarcinoma Zellen der Maus
FCS	Fötale Kalbserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GJ	Gap junction
GST	Glutathion-S-Transferase
GuK	Guanylatkinase homologe Domäne
h	Stunde
HEK	Humane embryonale Nierenepithelzellen
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
JAM	Junctional Adhesion Molekül
LB	Luria Bertani Medium
LC	Kapillarflüssigchromatografie
LC-ESI-MS/MS	Kapillarflüssigchromatografie-Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie
Lef	Lymphozyten <i>enhancer</i> Faktor
MAGUK	Membranassoziertes guanylatkinaseähnliches Protein
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MBP	Maltose-Bindeprotein
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
min	Minute
N-	Amino-

ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nPKC	Novel PKC
NRC	Rattennierenepithelzellen
Occ C	Occludin C Terminus
P	PDZ
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Par	partitioning-defective Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/DLG/ZO-1-Domäne
P-face	Protoplasmatische Hälfte
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Proteinphosphatase 1
P2AA	Proteinphosphatase 2A
PPP4	Proteinphosphatase 4
PS	Phosphatidylserin
PSD-95	post-synaptic density Protein 95
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q-TOF	Quadropole Time-of-Flight
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region des Interesses
RU	Resonanzeinheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatografie
s	Sekunden
SH3	Src oncogene homology region 3
ShG	SH3-hinge-GuK
SH3-h-GuK	SH3-hinge-GuK
SILAC	stable-isotope labelling by amino acids in cell culture
siRNA	Small interference RNA
SPR	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Triton
TCF	T-Zellfaktor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
TJ	Tight junction
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula Occludens Protein
ZONAB	ZO-1 associated nucleic acid binding protein



### Abkürzungen von Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

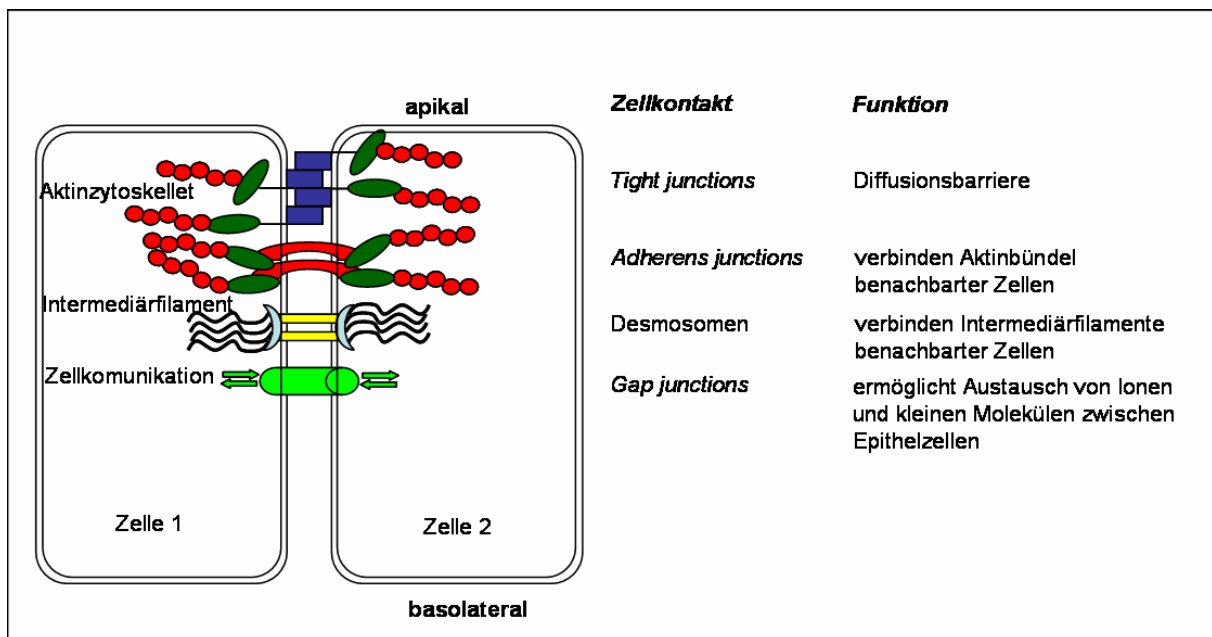
### Abkürzungen von Nukleotiden

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellkontakte in Epithel- und Endothelzellen

Epithelzellen kleiden die Körperhöhlen und Oberfläche des Organismus aus. Endothelzellen bedecken die Blut und Lymphgefäße. Sie bilden Kontakte zu benachbarten Epithel oder Endothelzellen und stabilisieren und unterteilen dadurch den Organismus. Die Zell-Zellverbindung wird von verschiedenen Proteinkomplexen mit unterschiedlichen Funktionen ausgebildet (Abb. 1).

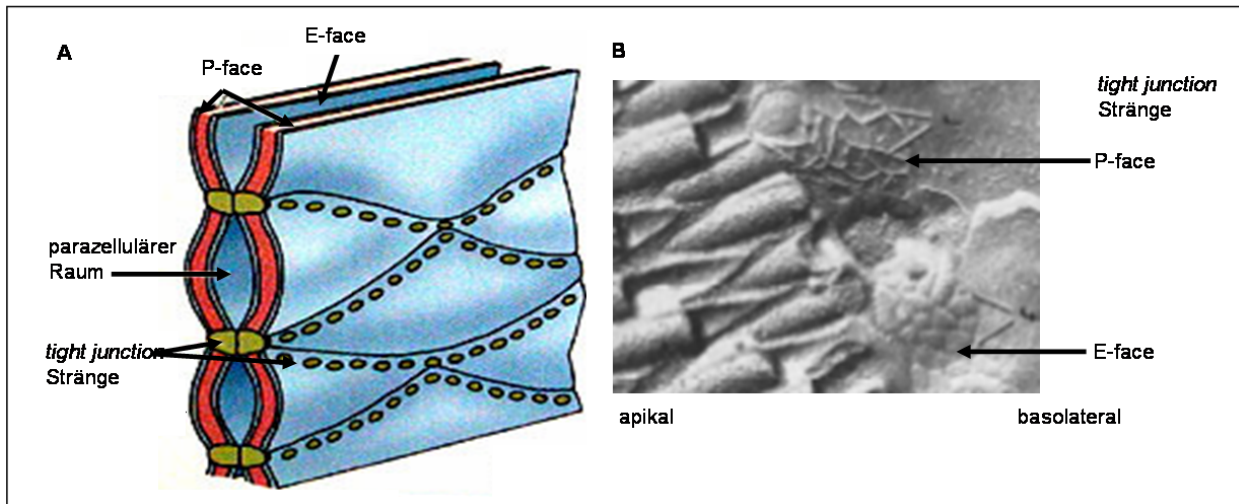


**Abb. 1: Schematische Darstellung von Epithelzellen mit verschiedenen Zellkontakten und deren Funktionen für die Zelle.**

Epithelzellen werden apikal durch die *tight junctions* (TJ) verbunden (Farquhar und Palade 1963). Ihre Aufgabe besteht im Verschluss des interzellulären Raumes (*gate function*). Dafür umspannen die TJ die Zelle gürtelförmig und bilden Kontakte zu den TJ der Nachbarzellen aus (Abb. 2 A).

Epithelzellen in verschiedenen Organen weisen unterschiedlich dichte TJ auf. Als Maß für die Dichtheit gilt der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) (Reuss 2001). Er variiert zwischen unterschiedlichen Geweben um den Faktor  $10^5$  (Van Itallie und Anderson 2006). Diese Unterschiede sind auch bei Endothelzellen zu beobachten, die im Gehirn sehr dichte TJ ausbilden im Gegensatz zu postkapillaren Venen (Bazzoni und Dejana 2004).

Mit der Gefrierbruchtechnik kann die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran in die protoplasmatische Hälfte (*P-face*) und die extrazelluläre Hälfte (*E-face*) getrennt werden (Staehelin 1973). Unter dem Elektronenmikroskop erscheinen die TJ als ein Netzwerk aus Strängen (Abb. 2 B), welches in Epithelzellen mit der protoplasmatischen Hälfte der Plasmamembran assoziiert ist. In Endothelzellen sind die TJ nach dem Gefrierbruch mit der *E-face* assoziiert (Simionescu et al. 1976; Muhleisen et al. 1989).



**Abb. 2: Die *tight junctions* stellen eine Verbindung zwischen zwei benachbarten Zellen her.**

**A** Schematische Darstellung zweier Zellmembranen (verändert nach <http://academic.brooklyn.cuny.edu>) mit TJ-Strängen, die den parazellulären Raum verschließen und die Zelle gürtelförmig durchziehen. **B** TJ-Stränge einer Epithelzelle in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie (Staehein 1973)

Eine Beteiligung der TJ an der Polarisierung der Zelle als Diffusionsbarriere (*fence function*) für Membranproteine und Lipide innerhalb einer Plasmamembran wird seit den achtziger Jahren diskutiert. Die Polarisierung der Zellmembran in einen apikalen und basolateralen Bereich ermöglicht einen gerichteten Transport über das Epithel. Experimente zur Diffusion von Proteinen und Lipiden in der Plasmamembran zeigen, dass die Diffusion an den TJ-Strängen unterbunden wird (Dragsten et al. 1981; Mandel et al. 1993). Andere Experimente zeigen, dass die Polarität in der Zelle ohne die für TJ typischen Stränge aus Claudinen ausgebildet werden kann (Fleming et al. 1989; Umeda et al. 2006). Wichtig für die Polarisierung der Zelle sind die Proteine des Polaritätskomplexes, zu denen die *partitioning-defective* Proteine (PAR) PAR-3, PAR-6 und die atypische Proteinkinase C zählen (Assemat et al. 2008; Paris et al. 2008).

*Adherens junctions* (AJ) schließen sich in Epithelzellen basolateral an die TJ an. Sie werden hauptsächlich durch die Membranproteine aus der Cadherin-Familie sowie  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin auf der zytoplasmatischen Seite gebildet. Zusammen mit den Desmosomen verbinden sie die Zytoskelette benachbarter Zellen. Epithel und Endothel unterscheiden sich wesentlich durch das Fehlen von Desmosomen in Endothelzellen. Des Weiteren vermischen sich TJ und AJ in Endothelzellen an der apikalen Zellseite (Bazzoni und Dejana 2004).

An der basolateralen Seite der Zellkontakte befinden sich die *Gap junctions* (GJ). Diese Zellkontakte ermöglichen einen Austausch von kleinen Molekülen bis 1000 Dalton (Da) zwischen benachbarten Zellen. Die GJ sind aus Connexinen aufgebaut, die als Hexamere eine Röhre, das Connexon, bilden. Diese Röhren verbinden die Zytosole zweier benachbarter Zellen. Connexine sind Membranproteine mit vier Transmembrandomänen. Es gibt 20 verschiedene humane Connexine, die mit sich selbst und anderen Connexinen Interaktionen ausbilden können (Giepmans 2004).

## 1.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine für Medikamente besonders schwer zu überwindende Diffusionsbarriere. Ihre natürliche Funktion ist der Schutz des Gehirns vor willkürlicher Aufnahme von Substanzen und Toxinen aus dem Blut. Die Blut-Hirn-Schranke wird neben den Endothelzellen mit den TJ durch Astrozyten, Perizyten, die Basallamina und Neuronen gebildet. Das Gehirn wird gezielt durch Transporter auf der luminalen Seite der Endothelzellen mit Nährstoffen wie Glukose und Aminosäuren aus dem Blut versorgt (Abbott 2002). Als weiterer Schutz des zentralen Nervensystems (ZNS) vor Toxinen stehen die *multidrug resistance*-Transporter zur Verfügung; eine Familie von Membranproteinen, die Moleküle aus der Zelle in das Blut zurücktransportieren (Sun et al. 2003).

Im Fall von Tumorerkrankungen im Gehirn ist es wünschenswert, die Blut-Hirn-Schranke temporär zu öffnen, um Medikamente auf dem parazellulären Weg in das betroffene Areal einzuschleusen. Bei der Alzheimer-Erkrankung, Multipler Sklerose, Demenz infolge einer HIV Infektion (Ballabh et al. 2004) sowie Epilepsie (Oby und Janigro 2006) kommt es zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Der ungehinderte Übertritt von Substanzen aus dem Blut in das Gehirn führt zu schwerwiegenden Schädigungen. Die Behandlung der Erkrankungen macht eine Manipulation der TJ notwendig. Für die gezielte Manipulation ist das Wissen über die zugrunde liegenden Proteininteraktionen und deren Regulation unerlässlich.

## 1.3 Die Proteine des *tight junction*-Komplexes

An den TJ sind mehr als 40 verschiedene Proteine bekannt, deren Funktion in vielen Übersichtsartikeln beschrieben wird (Chiba et al. 2008; Gonzalez-Mariscal et al. 2003; Gonzalez-Mariscal et al. 2008; Krause et al. 2008). Die beteiligten Proteine teilen sich funktionell in vier Gruppen: Membranproteine, Proteine des Polaritätskomplexes, Signaltransduktionsproteine sowie Adapterproteine (Paris et al. 2008). Zu den Membranproteinen gehören *junctional adhesion* Moleküle (JAMs), Claudine, Occludin und Tricellulin. Auf der zytosolischen Seite schließen sich die Adapterproteine an, die verschiedene Proteine der Signaltransduktion mit dem Zytoskelett, den Membranproteinen und Transkriptionsfaktoren verbinden. Die TJ sind nicht nur eine Barriere für die parazelluläre Permeabilität, sondern über die Signaltransduktion sind sie an komplexen Vorgängen wie der Zellproliferation und der Teilung von polaren Zellen in einen apikalen und einen basolateralen Bereich beteiligt.

### 1.3.1 *Junctional adhesion* Moleküle

Zu den Membranproteinen aus der Immunglobulin-Superfamilie zählen JAMs (Martin-Padura et al. 1998) und der Coxsackie und Adenovirus-Rezeptor (CAR)(Cohen et al. 2001). Sie bestehen aus zwei extrazellulären Immunglobulindomänen oder immunglobulinähnlichen Domänen im Fall von CAR (Tomko et al. 1997), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit PDZ (post-synaptic density protein 95 (PSD-95), dem Drosophila Tumorsuppressor Protein Disc large und Zonula Occludens Protein-1 (ZO-1)) Bindungsmotiv. Sie sind vermutlich an der Transmigration von Zellen des Immunsystems durch die Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Martin-Padura et al. 1998).

Es gibt drei homologe JAM Proteine: JAM A, B und C. JAMs interagieren mit ZO-1 (Itoh et al. 2001; Ebnet et al. 2003) sowie mit Par-3 (Ebnet et al. 2001), Cingulin, Occludin (Bazzoni et al. 2000) und Afadin (Ebnet et al. 2000) an den TJ. Eine Beteiligung von JAM A und CAR am Verschluss des

parazellulären Spaltes ist anzunehmen, da sie den TER beeinflussen (Liu et al. 2000; Mandell et al. 2005; Cohen et al. 2001).

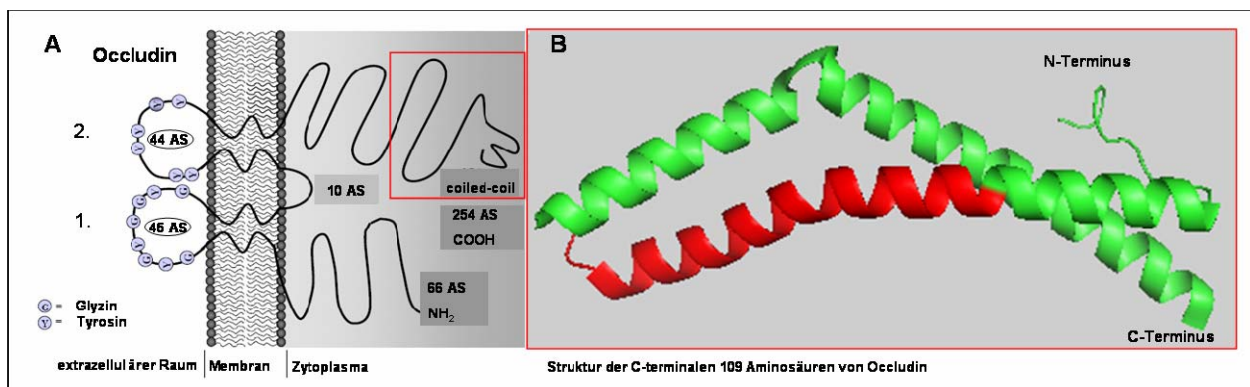
CAR ko-lokalisiert und ko-präzipitiert in Epithelzellen mit ZO-1 und verfügt über ein C-terminales PDZ-Bindemotiv, welches eine direkte Interaktion mit ZO-1 durch die PDZ-Domänen ermöglichen könnte (Cohen et al. 2001).

### 1.3.2 Tetraspannproteine

Tetraspannproteine zeichnen sich durch vier Transmembranhelices aus. Diese Struktur wurde durch bioinformatische Modelle (Kyte und Doolittle 1982) vorhergesagt. Eine vollständige Struktur liegt bisher von keinem der Proteine vor. Die Funktion der Tetraspannproteine ist der Verschluss des parazellulären Spaltes.

#### 1.3.2.1 Occludin

Occludin wurde 1993 von Furuse et al. als erstes integrales Membranprotein an den TJ in Epithelzellen entdeckt. Occludin ist 60-65 kDa groß und besitzt vier Transmembrandomänen (Abb. 3) (Furuse et al. 1993) sowie zwei extrazelluläre Schleifen. Die erste 45 Aminosäuren lange extrazelluläre Schleife zeichnet sich durch eine Häufung von Glycin und Tyrosin aus (Abb. 3 A). In der zweiten 44 Aminosäuren langen extrazellulären Schleife überwiegt die Aminosäure Tyrosin. Synthetische Peptide die den extrazellulären Schleifen von Occludin entsprechen, führen bei Inkubation mit Epithelzellkulturen zu einer Verminderung des TER. Daraus wird abgeleitet, dass Occludin mit seinen extrazellulären Schleifen zur Assoziation benachbarter Zellen beiträgt (Lacaz-Vieira et al. 1999; Wong und Gumbiner 1997).



**Abb. 3: Schematische Abbildung von Occludin**

**A** Darstellung von Occludin (Gonzalez-Mariscal et al. 2003). Der rote Kasten markiert die *coiled-coil*-Domäne am C-Terminus. **B** Schematische Darstellung der Struktur der C-terminalen 107 Aminosäuren von humanem Occludin basierend auf der Kristallstruktur von (Li et al. 2005). In rot ist ein 27 Aminosäuren langes Peptid markiert, welches mit verschiedenen TJ-Proteinen interagiert (Nusrat et al. 2000).

Untersuchungen in Zellen liefern ein widersprüchliches Bild der Beteiligung von Occludin am Verschluss des parazellulären Spaltes. Eine verstärkte Expression von Occludin in *Madin-Darby canine kidney* (MDCK)<sup>o</sup>II Zellen führt zu einer Erhöhung des TER (Balda et al. 1996b). Occludin defiziente Stammzellen zeigen hingegen nach Differenzierung in Epithelzellen keine Beeinträchtigung in der Polarität und den Barriereeigenschaften der TJ (Saitou et al. 1998). Die Expression von

## Einleitung

Occludin in TJ-losen Zellen führt zu kurzen Strängen aus Occludinmolekülen in der Plasmamembran. Bei Ko-Expression von Claudin 1 wird Occludin in Claudinstränge an den Zellkontakten eingebaut (Furuse et al. 1998).

Occludindeletion in Mäusen (Saitou et al. 2000) führt zu einem komplexen Phänotyp. Die Tiere zeigen ein verzögertes Wachstum, chronische Entzündungen und Kalziumanreicherung im Gehirn sowie Unfruchtbarkeit bei den männlichen Tieren und Verweigerung des Säugens bei den weiblichen Tieren. Eine morphologische oder elektrophysiologische Veränderung der TJ konnte nicht festgestellt werden. Damit bleibt der Beitrag von Occludin zum Verschluss des parazellulären Spaltes unklar.

Der N-terminale zytosolische Bereich von Occludin kommt in zwei Spleißvarianten vor. Die Variante 1a ist 66 Aminosäuren lang. Variante 1b enthält eine 193 Aminosäuren lange Insertion (Muresan et al. 2000).

Der 254 Aminosäuren lange C-Terminus von Occludin spielt eine Rolle bei der Organisation der TJ. Die Expression von Occludinmutanten ohne C-Terminus, führt zu einer Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit für niedermolekulare Substanzen (Balda et al. 1996b). Der C-Terminus zeichnet sich durch einen proteolytisch-stabilen Bereich aus (Peng et al. 2003), der in der Kristallstruktur eine *coiled-coil*-Domäne bildet (Abb. 3 B) (Li et al. 2005). Der C-Terminus von Occludin bindet direkt an F-Aktin und ist damit bisher das einzige Membranprotein an den TJ, welches eine direkte Verbindung zum Zytoskelett vermittelt (Wittchen et al. 1999). Ein 27 Aminosäure langes Peptid (Abb. 3 B rot), aus der *coiled-coil*-Domäne interagiert mit ZO-1, Proteinkinase C (PKC)  $\zeta$ , c-Yes, der regulatorischen Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase und Connexin 26 in T84 Epithelzellen (Nusrat et al. 2000).

Occludin interagiert mit allen drei ZO-Proteinen (Furuse et al. 1994; Haskins et al. 1998; Itoh et al. 1999b). Die Interaktion mit ZO-1 kann auf die SH3-*hinge*-GuK-Einheit eingegrenzt werden (Fanning et al. 1998; Schmidt et al. 2004). Müller et. al veröffentlichten 2005 ein Modell der Interaktion der ZO-1 SH3-*hinge*-GuK-Einheit mit dem C-Terminus von Occludin (Abb. 6). Das Modell sagt eine Dimerisierung der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin über elektrostatische Wechselwirkungen voraus. Die Dimerisierung der isolierten C-terminalen *coiled-coil* Domäne von Occludin kann *in vitro* mit verschiedenen Methoden gezeigt werden (Blasig et al. 2006; Muller et al. 2005). Eine Selbstinteraktion von Occludin in HEK 293-Zellen wurde mit Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Messungen nachgewiesen (Blasig et al. 2006).

Eine Funktion von Occludin in der Signaltransduktion an den TJ wird angenommen. Occludin kann am C-Terminus stark phosphoryliert werden. Es wurden Phosphorylierungen an Serin, Threonin (Andreeva et al. 2001; Sakakibara et al. 1997) und Tyrosin (Chen et al. 2002; Sheth et al. 2003) nachgewiesen. Der Grad der Phosphorylierung korreliert mit der Lokalisation von Occludin an den TJ (Wong 1997). Oxidativer Stress bewirkt eine Öffnung der TJ, welche mit Tyrosin-Phosphorylierung von Occludin und ZO-1 durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase einhergeht. Die Phosphorylierung führt zum Verlust der Interaktion mit Aktin (Sheth et al. 2003). Während der Rückbildung der TJ ist eine Dephosphorylierung von Occludin an Threoninen, nicht aber an Serinen zu beobachten. Verantwortlich für die Dephosphorylierung an Threoninen ist die Proteinphosphatase 2A (P2AA). Proteinphosphatase 1 dephosphoryliert Occludin an Serinen in CACO2 Zellen (Seth et al. 2007).

### 1.3.2.2 Claudine

Es gibt 24 Claudine in Säugetieren (Furuse und Tsukita 2006). Sie sind 18-27 kDa groß. Claudine werden gewebespezifisch exprimiert und beeinflussen die parazelluläre Permeabilität zwischen Epithel- und Endothelzellen. Diese Funktion ist für Claudin (Cld) 4, 5, 8, 11, 14 und 19 nachgewiesen. Man bezeichnet sie daher als abdichtende Claudine (Krause et al. 2008). Claudine können mit sich selbst und anderen Claudinen interagieren. Die Interaktion von Claudinen derselben Zelle führt zur Ausbildung der TJ-Stränge (Blasig et al. 2006). Durch Interaktion mit Claudinen benachbarter Zellen verschließen sie den parazellulären Spalt für Moleküle bis 800 Da. Cld 5 verschließt den parazellulären Spalt zusätzlich für Moleküle kleiner 800 Da, wie in *knock out* Mäusen gezeigt wurde (Nitta et al. 2003). Untersuchungen an Cld 5 in HEK 293-Zellen zeigen, dass die Interaktion über die zweite extrazelluläre Schleife vermittelt wird (Piontek et al. 2008). An den TJ in Gehirnkapillarendothelzellen werden Cld 3, Cld 5 und Cld 12 exprimiert (Morita et al. 1999; Nitta et al. 2003; Wolburg et al. 2003).

Die Claudine 2, 7, 10, 15 und 16 können Poren für Ionen bilden (Krause et al. 2008). Sie werden auch als Poren formende Claudine bezeichnet. Die Selektivität der Claudinporen für Ionen wird durch die geladenen Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife und das Expressionsmuster der Claudine in den verschiedenen Epithelzellen bestimmt (Angelow et al. 2008; Colegio et al. 2003). So führen Mutationen in der ersten extrazellulären Schleife von Cld 16 zu Magnesiumverlust in der Niere (Simon et al. 1999).

Wie die Claudine an die TJ transportiert werden und dort Stränge ausbilden, ist gegenwärtig ungeklärt. Eine Möglichkeit ist die Interaktion mit den ZO-Adapterproteinen. Eine Interaktion über den C-Terminus an die PDZ 1-Domäne der ZO-Proteine wurde für viele Claudine experimentell nachgewiesen (s. auch 1.3.5.1). Ikenouchi et al. (2007) zeigten, dass in Abwesenheit der Adapterproteine ZO-1 und ZO-2 in Eph4 Epithelzellen, die kein ZO-3 exprimieren, keine TJ ausgebildet werden. Transfiziert man diese Zellen mit den PDZ-Domänen 1-3, die mit einer Membranlokalisationssequenz und einer induzierbaren Dimerisierungssequenz ausgestattet sind, führt dies nach Induktion der Dimerisierung zur Polymerisation von Claudinen in der lateralen Plasmamembran. Die Erweiterung der ZO-1-Sequenz gewährleistet die Lokalisation an der apikalen Seite der Zellmembran (Ikenouchi et al. 2007). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Ruffer und Gerke, dass Cld 1 und Cld 5 ohne das C-terminale PDZ-Bindungsmotiv an den TJ lokalisieren (Ruffer und Gerke 2004). Furuse et al. zeigten, dass die Transfektion von Cld 1 und 2 in TJ-lose Maus-Fibroblasten ausreichend für die Ausbildung von TJ-Strängen ist (Furuse et al. 1998). Für Cld 14 wurde die Palmitoylierung des C-Terminus als ausschlaggebend für eine Membranlokalisierung und den Einbau in TJ gefunden (Van Itallie et al. 2005)

### 1.3.2.3 Tricellulin

An Zellkontakten, bei denen drei Epithelzellen aufeinandertreffen, wird Tricellulin gefunden. Der C-Terminus dieses Proteins ist homolog zu Occludin (Ikenouchi et al. 2005). Tricellulin bindet *in vitro* an ZO-1. Es spielt eine wichtige Rolle beim Hören. Eine erbliche Form von Taubheit beim Menschen kann auf unterschiedliche Punktmutationen in Tricellulin zurückgeführt werden. Eine Mutante die Taubheit verursacht, zeigt eine reduzierte Bindung an ZO-1 (Riazuddin et al. 2006).

### 1.3.3 Zonula Occludens-Proteine

Die ZO-Proteine gehören zur Familie der Membran assoziierten Guanylatkinase ähnlichen Proteine (MAGUK). MAGUK-Proteine bestehen aus 1-3 PDZ-Domänen einer *Src homology 3*-Domäne (SH3-Domäne) und einer Guanylatkinase ähnlichen Domäne (GuK-Domäne) ohne enzymatische Aktivität (Anderson 1996; Olsen und Bredt 2003). Die Bedeutung der zytosolischen ZO-Proteine liegt in ihrer Adapterfunktion, als Verbindung zwischen zahlreichen Membranproteinen der Zellkontakte, dem Zytoskelett und Proteinen der Signalverarbeitung. Sie werden mit der Rekrutierung von Membranproteinen an die AJ und TJ in Verbindung gebracht (Ikenouchi et al. 2007). Es gibt drei zytosolische ZO-Proteine. Für ZO-1 und ZO-2 ist eine Kernlokalisierung in Zellen ohne Zellkontakte und nach chemischem oder mechanischem Stress nachgewiesen (Gottardi et al. 1996; Islas et al. 2002; Traweger et al. 2003).

#### 1.3.3.1 Zonula Occludens-Protein-1

Das größte ZO-Protein ZO-1 wurde 1986 zuerst von Stevenson et al. beschrieben (Stevenson et al. 1986). Eine erste funktionelle Untersuchung durch Anderson erbrachte, dass es sich um ein 210-225 kDa großes zytosolisches, membranassoziertes Phosphoprotein handelt (Anderson et al. 1988). 1993 wurde die cDNA isoliert und sequenziert. Aufgrund der DNA-Sequenz wurde die Homologie mit dem *tumor suppressor disc large* aus *Drosophila* und dem *post synaptic density* Protein (PSD95/SAP90) erkannt (Willott et al. 1993). Eine Charakterisierung von ZO-1 aus MDCK Zellen führte zur Entdeckung von zwei Kernlokalisationssequenzen und 17 SH3-Bindungssequenzen in der prolinreichen Region (Gonzalez-Mariscal et al. 1999).

ZO-1 existiert in zwei verschiedenen *Splicing*-Formen, die sich durch eine 80 Aminosäuren lange  $\alpha$ -Domäne am C-Terminus von ZO-1 unterscheiden. Beide *Splicing*-Formen werden in Epithel und Endothelzellen exprimiert. Wobei die  $\alpha^+$ Form in Epithelzellen und die  $\alpha^-$ Form in Endothelzellen überwiegt (Balda und Anderson 1993; Kurihara et al. 1992). Funktionell wird die  $\alpha^+$ Form mit stabilen TJ in Verbindung gebracht, während die  $\alpha^-$ Form mit strukturell dynamischen TJ verbunden ist. Im frühen Stadium der Mausentwicklung wird erst die  $\alpha^-$ Form exprimiert und nachfolgend die  $\alpha^+$ Form (Sheth et al. 1997).

#### 1.3.3.2 Zonula Occludens-Protein-2

ZO-2 ist ein 160 kDa großes Phosphoprotein (Gumbiner et al. 1991), welches durch Kopräzipitation mit ZO-1 entdeckt wurde. Die Interaktion verläuft über die zweite PDZ-Domäne (Wittchen et al. 1999) beider Proteine. Es ist homolog zu ZO-1 aufgebaut, jedoch am N-Terminus kürzer (Jesaitis und Goodenough 1994).

#### 1.3.3.3 Zonula Occludens-Protein-3

ZO-3 wurde als 130 kDa Phosphoprotein an TJ identifiziert (Balda et al. 1993). Eine Besonderheit von ZO-3 ist, dass die prolinreiche Region, die sich bei ZO-1 und ZO-2 an die SH3-*hinge*-GuK-Einheit anschließt, sich zwischen der zweiten und dritten PDZ-Domäne befindet (Haskins et al. 1998). Es wird in Epithelzellen exprimiert. In Endothelzellen kommt kein ZO-3 vor (Inoko et al. 2003). Die Funktion von ZO-3 ist bisher am wenigsten verstanden.



#### 1.3.4 Funktion der Zonula Occludens-Proteine in der Zellkontaktbildung

In Epithelzellen wurde eine teilweise redundante Funktion der ZO-Proteine nachgewiesen. Durch Deletion von ZO-1 auf Genebene und Unterdrückung der ZO-2 Expression mit siRNA wurden in der epithelialen Zelllinie Eph4, die kein ZO-3 exprimiert, Studien zur Funktion der ZO-Proteine durchgeführt. Diese ZO defizienten Zellen bilden keine TJ aus. Die Zellpolarität ist jedoch entwickelt. Transfiziert man die ZO defizienten Zellen mit ZO-3, wird dieses nicht an die TJ rekrutiert (Umeda et al. 2006), obwohl es mit der PDZ 1-Domäne an Cld 1-8 bindet (Itoh et al. 1999a). Die Funktion von ZO-2 und ZO-3 wurde in einer Studie von Xu et al 2008 in Mäusen untersucht, bei denen entweder ZO-2 oder ZO-3 ausgeschaltet wurden. Die Mäuse ohne ZO-2 starben als Embryos an Tag 6, während die ZO-3 defizienten Mäuse ohne erkennbaren Phenotyp lebensfähig waren. Diese Befunde decken sich mit der Arbeit von Adachi et al. 2006 zur Funktion von ZO-3 in Mäusen und F9 *Teratocarcinoma*-Zellen. Die einzige Auffälligkeit der ZO-3 *knock out* Zellen war eine verstärkte Expression von ZO-2. Daraus wird geschlossen, dass ZO-3 keinen direkten Einfluss auf die TJ-Bildung hat.

Die Ausbildung der TJ ist kalziumabhängig. In Medium mit wenig Kalzium (1-5  $\mu\text{M}$ ) öffnen sich die TJ. Erhöht man die Kalziumkonzentration auf 1,8 mM, kann man die Ausbildung der TJ anhand des steigenden TERs verfolgen. Die Veränderung der Kalziumkonzentration im Medium von Epithel- oder Endothelzellkulturen bezeichnet man als *Calcium switch*. Die Expression des N-Terminus mit den PDZ-Domänen und der prolinreichen Region von ZO-3 führt zu einer Verlangsamung in der AJ und TJ Ausbildung in MDCK Zellen nach *Calcium switch* (Wittchen et al. 2000). Eine verlangsamte Ausbildung von TJ nach *Calcium switch* ist auch bei ZO-1 Verminderung in MDCK Zellen zu beobachten (McNeil 2006). Die SH3-Domäne von ZO-1 war ausreichend, um die Verzögerung zu beheben. Die Ergebnisse der Deletionsstudien sind in Tab. 1 zusammengefasst. Sie weisen darauf hin, dass die größte Gemeinsamkeit zwischen ZO-1 und ZO-2 besteht. Jedoch scheinen die beiden Proteine zusätzlich spezifische Funktionen zu haben, wie die Letalität der ZO-2 Deletion in Mäusen zeigt.

**Tab. 1: Phänotypen hervorgerufen durch Deletion oder Unterdrückung der Expression von Zonula Occludens Proteinen**

Protein	Modell	Methode	Effekt	Referenz
ZO-1	Eph4	Genausschaltung	Verzögerte TJ Bildung/ vermehrte ZO-2 Expression Cingulin wird nicht an TJ rekrutiert.	(Umeda et al. 2004)
	MCF-10°/ MDCK	RNA Interferenz	Verringerter TER/erhöhte Zellproliferation	(Sourisseau et al. 2006)
	MDCK 3D Kultur	RNA Interferenz	Veränderte Morphologie der Zysten	(Sourisseau et al. 2006)
	MDCK	RNA Interferenz	Verzögerte TJ Bildung	(McNeil et al. 2006)
ZO-1, ZO-2 und ZO-3	Eph4	Genausschaltung/ RNA Interferenz	Keine Ausbildung von TJ/ verzögerte AJ Bildung Zellpolarität vorhanden	(Ikenouchi et al. 2007)
ZO-2	MDCK	RNA Interferenz	Normale TJ Entwicklung	(McNeil et al. 2006)
	MDCK	RNA Interferenz	Verlust der Zellpolarität, erhöhte Durchlässigkeit, verspätete TJ Ausbildung, veränderte Morphologie	(Hernandez et al. 2007)
	Mäuse	Genausschaltung	Letal für Embryonen	(Xu et al. 2008)
ZO-2 und ZO-3	F9	Genausschaltung/ RNA Interferenz	Kein Effekt	(Adachi et al. 2006)
ZO-3	F9 Zellen/Maus	Genausschaltung	Vermehrte ZO-2 Expression/ kein erkennbarer Phänotyp	(Adachi et al. 2006)
	Mäuse	Genausschaltung	Kein erkennbarer Phänotyp	(Xu et al. 2008)

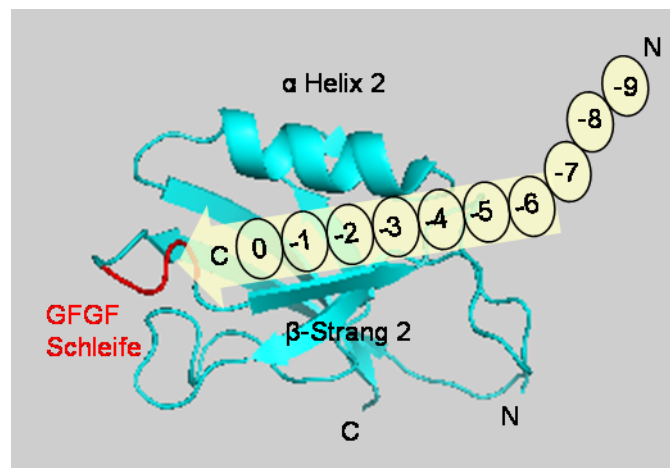
### 1.3.5 Die proteinbindenden Domänen von Zonula Occludens-Protein-1

Die Rekrutierung von ZO-1 an die Zellmembran ist noch nicht geklärt. Die PDZ-Domänen allein reichen trotz der vielen membranalen Bindungspartner nicht für eine Membranlokalisation aus (Reichert et al. 2000; Umeda et al. 2006). Die SH3-*hinge*-GuK-Einheit und die saure Region spielen eine Rolle (Umeda et al. 2006). Occludin und  $\alpha$ -Catenin binden an die SH3-*hinge*-GuK-Einheit der ZO-Proteine und werden als Rekrutierungspartner von ZO-1 diskutiert. Das Fehlen einer der beiden Proteine hat keine Auswirkung auf die Membranlokalisation von ZO-1 (Saitou et al. 1998; Watabe et al. 1994; Yokoyama et al. 2001). Auch der Nectin-Afadin Komplex könnte eine Rolle bei der Lokalisation spielen (Yamada et al. 2006).

### 1.3.5.1 PDZ-Domänen

PDZ-Domänen sind 80 bis 100 Aminosäuren lange, proteinbindende Domänen. Sie bestehen aus 5-6  $\beta$  Strängen und 1-2  $\alpha$  Helices (Appleton et al. 2006; Jemth und Gianni 2007). Sie sind benannt nach den Proteinen in denen sie zuerst entdeckt wurden: dem *post-synaptic density* Protein 95 (PSD-95), dem *Drosophila tumor suppressor* Protein *disc large* und ZO-1. PDZ Domänen kommen in allen eukaryotischen Organismen und über horizontalen Gentransfer auch in Bakterien vor (Ponting 1997).

Ihre Funktion in Proteinen mit mehreren proteinbindenden Domänen ist die Bündelung von Proteinen zu Komplexen. Dafür interagieren sie entweder mit dem C-Terminus eines Proteins oder mit internen Motiven (Harris und Lim 2001). Die Bindung der Liganden erfolgt über die Ausbildung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes mit dem  $\beta$ -Strang 2 der PDZ-Domäne. Der C-Terminus des Liganden interagiert zusätzlich mit der GLGF-Schleife, die meistens aus Glycin und den hydrophoben Aminosäuren Leucin und Phenylalanin besteht.. Die Nomenklatur der Aminosäuren des Liganden beginnt mit 0 für die C-terminale Aminosäure und verläuft absteigend (Abb. 4).

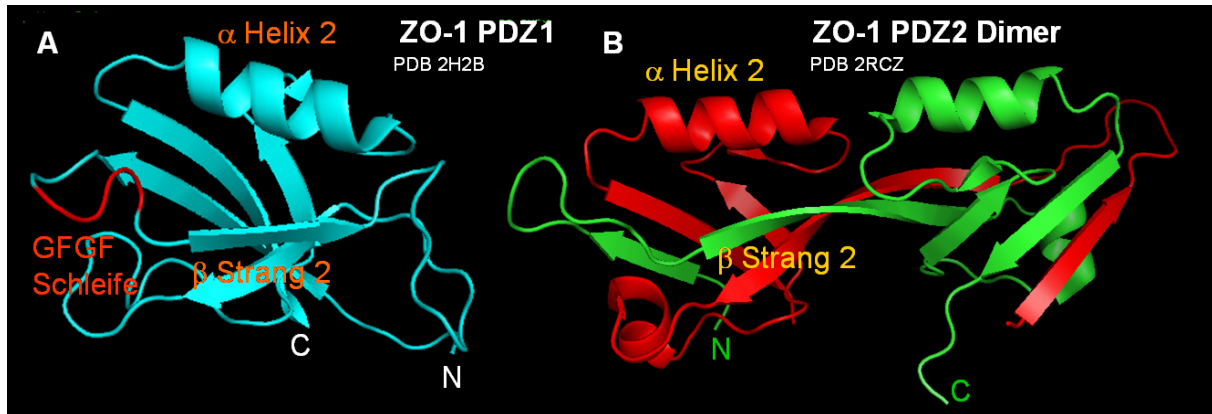


**Abb. 4: Schematische Darstellung der Ligandenbindung an die PDZ 1-Domäne**

In gelb eingezeichnet ein möglicher Ligand, mit Nomenklatur der Aminosäuren. Rot sind die Aminosäuren GFGF der PDZ-Domäne gekennzeichnet, die den C-Terminus des Liganden binden. Grundlage für die Darstellung ist die Kristallstruktur der PDZ 1-Domäne von ZO-1 (Appleton et al. 2006).

Die Strukturen der PDZ 1-Domäne und der PDZ 2-Domäne sind bekannt (Appleton et al. 2006; Fanning et al. 2007b). Die Bindetasche der PDZ 1-Domäne wird aus der Helix  $\alpha$ -2 und dem  $\beta$ -2 Strang und den Aminosäuren Glycin und Phenylalanin in der GLGF-Schleife gebildet (Abb. 5 A). Abweichend von den meisten PDZ-Domänen fehlt bei PDZ 1 die zweite  $\alpha$ -Helix.

Für die PDZ 2-Domäne wurde ein neuer Mechanismus der Selbstassoziation aufgedeckt (Fanning et al. 2007b; Utepbergenov et al. 2006). Bei der PDZ 2-Domäne wird die Bindungstasche erst durch die Interaktion von zwei PDZ 2-Domänen gebildet (Abb. 5 B). Auffallend in der Sequenz der PDZ 2-Domäne ist die Abwesenheit der GLGF-Schleife.



**Abb. 5: Strukturen der PDZ 1 und PDZ 2-Domäne von Zonula Occludens -1**

**A** Darstellung der Kristallstruktur der PDZ 1 nach PDB 2H2B (Appleton et al. 2006) **B** ZO-1 PDZ 2 Dimer basierend auf der Kristallstruktur PDB 2RCZ (Fanning et al. 2007b).

Begleitend zur Kristallstruktur der PDZ 1-Domäne wurde ein Bindungsprofil der PDZ 1 und PDZ 3-Domäne mit *Phagen Display* Technik ermittelt. In dem Versuch wurde eine Zufallsbibliothek aus 10 Aminosäure-langen Peptiden erzeugt und mit den PDZ-Domänen 1 oder 3 inkubiert. Die gebundenen Peptide wurden anschließend sequenziert. Dadurch wurden folgende Präferenzen für die Bindung von Liganden ermittelt: Die PDZ 1-Domäne bindet in der Position -3 [R/K/S/T], -2 [T/S], -1 [W/Y] und 0 [V/I/L]<sub>COOH</sub>. Die PDZ 3-Domäne zeigt ein engeres Ligandenspektrum in Position -3 und -1. Sie bindet bevorzugt die Aminosäuren in der Position -3 [S/T], -2 [X], -1 [W] und 0 [V/I/L]<sub>COOH</sub>, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht (Zhang et al. 2006).

In Tab. 2 sind bisher bekannte Bindungspartner der PDZ-Domänen von ZO-1 zusammengefasst. Für eine Manipulation der Dichtheit der TJ ist dabei vor allem die Interaktion mit Claudinen von Interesse. Bisher nachgewiesen wurde die direkte Bindung an Cld 1-8, 10, 14, 16, 17 und 20 (Ikari et al. 2004; Itoh et al. 1999a; Zhang et al. 2006). Die Deletion der letzten drei Aminosäuren von Claudin 16 sowie Alanin Substitutionen in Position 0 und -2 führten zu einer erhöhten Durchlässigkeit für Kalzium- und Magnesiumionen von der apikalen zur basolateralen Seite in einer MDCK-Zellschicht. Dieser Phenotyp ist auch in Patienten bekannt, die an Hyperkalzämie und Hypomagnesiämie leiden. Die Krankheit geht auf einen Austausch in der Position -2 (Threonin 233) gegen Arginin zurück. Dieser Austausch unterbindet die Assoziation mit ZO-1 und führt zu einer Akkumulation von Cld 16 in Lysosomen (Muller et al. 2003).

Welche Rolle die Interaktion mit ZO-Proteinen für die Rekrutierung der Claudine an die TJ spielt, dazu gibt es unterschiedliche experimentelle Befunde. Für Cld 4 wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung in Position -2 (Tyr<sup>208</sup>) durch die Kinase EphA2 die Ko-Lokalisation mit ZO-1 vermindert. Gleichzeitig nimmt die Lokalisation von Cld 4 an den TJ ab und die parazelluläre Permeabilität steigt (Tanaka et al. 2005).

**Tab. 2: Bindungspartner der PDZ-Domänen von Zonula Occludens 1**

PDZ	Bindungspartner	Referenz
PDZ1	Cld 1-8	(Itoh et al. 1999a)
	Cld 16	(Ikari et al. 2004; Zhang et al. 2006)
	ARVCF	(Kausalya et al. 2004)
	$\alpha$ -Actinin-4	(Chen et al. 2006)
	Connexin 36	(Li et al. 2004)
PDZ2	Connexine 40, 43, 45, 46, 50, 31,9	(Giepmans 2004; Bouvier et al. 2008)
	ZO-2, ZO-3	(Wittchen et al. 1999)
	ARVCF	(Kausalya et al. 2004)
PDZ3	JAM 1	(Bazzoni et al. 2000; Itoh et al. 2001)

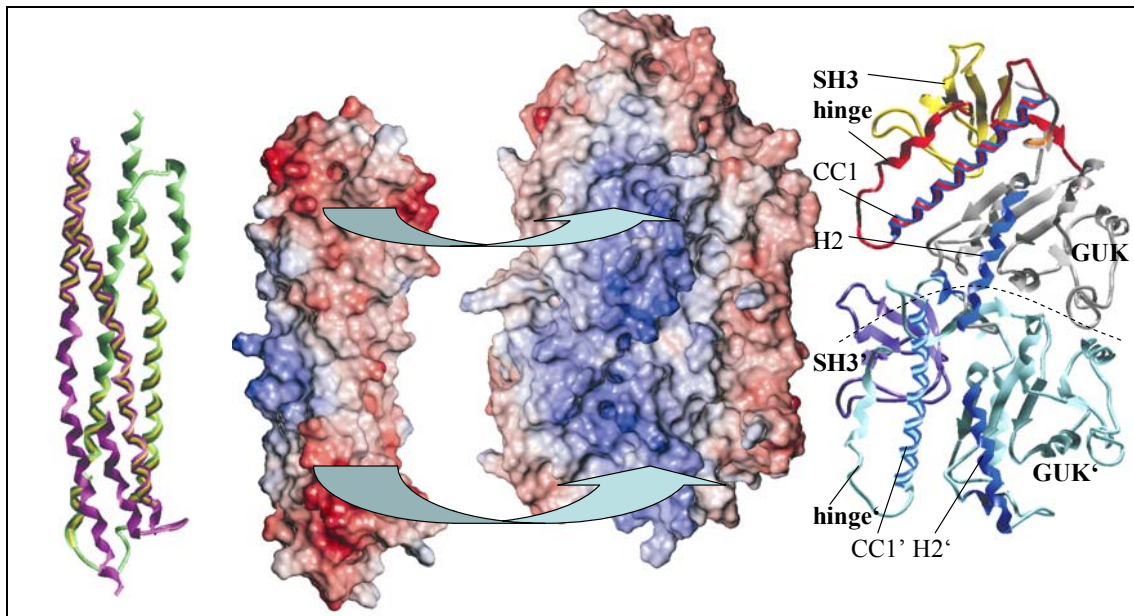
Für Cld 5 wurde eine Phosphorylierung in Position -11 (Thr<sup>207</sup>) in Schweineendothelzellen durch die Proteinkinase A nach Stimulation mit zyklischem AMP festgestellt (Ishizaki et al. 2003). Expression von Cld 5 und einer Mutante mit Threoninsubstitution gegen Alanin in Position 207 (T207A) führen zum Anstieg des TER in einem Cld 5 freien Zellsystem von Rattenlungenendothelzellen. Die Mutante Cld 5 T207A erhöht den TER stärker als der Wildtyp. Messungen des parazellulären Flux zeigen, dass beide Cld 5 Zelllinien den Fluss von Inulin (5 kDa) verringern. Die Mutante T207A verringert zusätzlich den Austausch von Manitol (182 Da) (Soma et al. 2004). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Phosphorylierung eine Bedeutung bei der Regulation der Bindung von PDZ 1 an Claudine hat.

Für Cld 1 wurde durch Austausch von Thr<sup>203</sup> gegen Alanin die Phosphorylierung durch die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) untersucht. Eine Phosphorylierung von Thr<sup>203</sup> führte hier zu einer Verstärkung der Barrierefunktion von Cld 1 (Fujibe et al. 2004). Cld 1 Mutanten mit Deletion oder Blockade der 4 C-terminalen Aminosäuren entwickeln kurze unzusammenhängende TJ-Stränge. Trotzdem ko-lokalisieren die Cld 1 Mutanten mit ZO-1 an den TJ in MDCK Zellen. Die Rekrutierung der Cld 1 Mutante in die TJ-Stränge könnte dabei durch eine Interaktion mit anderen Claudinen verursacht werden (Kobayashi et al. 2002). Diese Claudine könnten dann wiederum für die Assoziation mit ZO-1 verantwortlich sein. Die Experimente zeigen, dass die Interaktion von ZO-1 mit Claudinen eine Möglichkeit darstellt, den TJ-Aufbau zu beeinflussen.

### 1.3.5.2 SH3-hinge-GuK-Einheit

Die SH3 und GuK-Domäne werden über den sogenannten Drehangel oder *hinge* Bereich verbunden. Der Bereich von SH3 bis zur GuK-Domäne wird für das MAGUK-Protein PSD 95 als eine funktionelle Einheit beschrieben, die zur Selbstassoziation befähigt ist. Die Kristallstruktur zeigt eine Interaktion der SH3 mit der GuK-Domäne, die zur Ausbildung von Oligomeren der Einheit führen kann. Dabei kommt dem *hinge* Bereich eine besondere Bedeutung bei der Regulation der Oligomerisierung zu. In Experimenten wurde gezeigt, dass eine erhöhte Rigidität zur Oligomerisierung der Einheit führt (McGee et al. 2001). Es wird spekuliert, dass so eine Versteifung durch die Bindung eines Liganden eintreten könnte. Auf Grundlage der Kristallstruktur von PSD 95 wurde für ZO-1 ein Homologie-Modell erzeugt (Muller et al. 2005). Als mögliche Auslöser für die Oligomerisierung der SH3-hinge-GuK-Domäne werden Occludin und  $\alpha$ -Catenin diskutiert, da sie in diesem Bereich an ZO-1 binden. Der

mögliche Mechanismus der Bindung des Dimers von Occludin an die SH3-*hinge* GuK-Domäne wird in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6: Interaktionsmodell der Dimere der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin und der SH3-*hinge*-GuK-Einheit aus ZO-1**

Interaktionsmodell basierend auf Homologien mit dem Serin-Chemotaxisrezeptor (PDB:1QU7) für das Occludin Dimer des C-Terminus links im Bild und dem Dimer der SH3-*hinge*-GuK-Einheit entwickelt auf Grundlage der Kristallstruktur von PSD 95 rechts im Bild (Muller et al. 2005). Die vorhergesagten Interaktionsareale in ZO-SH3-*hinge*-GuK sind Helix 2 (H2) und *coiled-coil* 1 (cc1). In der Mitte sind die Dimere unter Berücksichtigung der elektrischen Oberflächenpotenziale dargestellt. Die nukleophilen Bereiche sind rot, die elektrophilen Bereiche sind blau dargestellt.

Eine weitere strukturelle Besonderheit der SH3-Domäne ist, dass die  $3_{10}$  Helix, die für eine Bindung an prolinreiche Motive mit der Sequenz PxxP benötigt wird, fehlt (McGee et al. 2001). Eine  $3_{10}$  Helix wird auch im Modell von ZO-1 nicht vorhergesagt (Muller et al. 2005). An ihre Stelle tritt bei der MAGUK-SH3-Domäne der *hinge*. Aus der Aminosäuresequenz der GuK-Domäne geht hervor, dass sie keine Nukleotidbindungsstellen besitzt. Daher wird angenommen, dass sie enzymatisch inaktiv ist und eine proteinbindende Funktion erfüllt (Anderson 1996; Kim et al. 1997). Die SH3-*hinge*-GuK Einheit bindet Occludin (Furuse et al. 1994; Schmidt et al. 2004), Tricellulin (Riazuddin et al. 2006) sowie die *Adherens junction*-Proteine  $\alpha$ -Catenin (Itoh et al. 1997; Muller et al. 2005) und Afadin (Yamamoto et al. 1997). Die SH3-Domäne bindet den Transkriptionsfaktor ZONAB (Balda und Matter 2000) und eine ZO-1 assoziierte Kinase von der es im *hinge* phosphoryliert wird (Balda et al. 1996a). Des Weiteren bindet das Chaperon Apg-2 in der SH3-Domäne, welches kompetitiv die Interaktion mit ZONAB reguliert (Tsapara et al. 2006).

### 1.3.6 Verbindung von Zonula Occludens Proteinen zum Zytoskelett

Der N-terminale Bereich hinter der GuK-Domäne enthält saure und prolinreiche Abschnitte. Er etabliert eine Verbindung zum Zytoskelett, indem er mit F-Aktin (Fanning et al. 2002; Itoh et al. 1997) und dem Aktinbindendenprotein 4.1 (Muller et al. 2005) interagiert. Zusätzlich interagiert ZO-1 mit dem Adapterprotein Shroom 2 an den TJ. Shroom 2 interagiert mit Myosin VIIa und stellt somit eine weitere Verbindung zum Zytoskelett her (Etournay et al. 2007). Cortaktin, ein Onkogen, welches ebenfalls an

Aktin bindet, interagiert über seine SH3-Domäne mit der prolinreichen Region von ZO-1 (Katsube et al. 1998). Cingulin ist ein zytosolisches Protein an den TJ, dessen Überexpression zu einer Verdrängung von ZO-1 führt. Es interagiert mit allen drei ZO-Proteinen, F-Aktin und Myosin (Cordenonsi et al. 1999; D'Atri und Citi 2001; D'Atri et al. 2002).

### **1.4 Zonula Occludens Proteine und die Signaltransduktion an den *tight junction***

Eine Verbindung der ZO-Proteine zur Signaltransduktion an den TJ mit Auswirkungen auf den Verschluss des parazellulären Spaltes wurde von Stevenson et al. erstmals beschrieben. Sie fanden heraus, je stärker ZO-1 phosphoryliert war, desto undichter wurden die TJ zwischen MDCK Zellen (Stevenson et al. 1989). Seitdem wurde eine Vielzahl von Proteinen entdeckt, welche über die Signaltransduktion und Genexpression die Zellproliferation und Dichtheit der TJ beeinflussen (Gonzalez-Mariscal et al. 2008). Dazu gehört die Proteinkinase C (Stuart und Nigam 1995), die ZO-1 phosphoryliert. Welche Aminosäuren phosphoryliert werden, ist im Einzelnen nicht bekannt. Die Rolle der 12 verschiedenen PKC-Isoformen auf die TJ-Entwicklung wird zurzeit erforscht. Durch die Stimulierung und Hemmung verschiedener Isoformen wurden die konventionellen PKCs (cPKCs), die durch Kalzium und Diacylglycerin aktiviert werden, als Auslöser der TJ-Auflösung beschrieben. Zu den cPKCs zählen die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma$ . Novel-Isoformen (nPKCs), die Kalzium unabhängig aber Diacylglycerin abhängig aktiviert werden, werden mit der Ausbildung der TJ in Verbindung gebracht (Andreeva et al. 2006). Die nPKCs umfassen  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ . Eine weitere Klasse, die atypischen PKCs (aPKCs), benötigen weder Kalzium noch Diacylglycerin und beinhalten die Isoformen  $\lambda$ ,  $\tau$ ,  $\zeta$ . Für die Isoformen  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\zeta$  wurde eine Ko-Lokalisation mit ZO-1 beschrieben (Eckert et al. 2004). ZO-2 ist Zielprotein für die PKCs  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  (Avila-Flores et al. 2001).

Eine weitere Verbindung von ZO-1 zur Signaltransduktion über die Proteine  $\beta$ -Catenin, Tcf, Lef, beschreibt die Studie von Reichert. Die Expression der PDZ-Domänen in epithelialen MDCK I Zellen verursacht eine Umwandlung in einen mesenchymalen Zelltyp. Diese Umwandlung induziert die Tumoreigenschaften der Zelle (Reichert et al. 2000). Einen Überblick über die ZO-Proteine und ihre Bindungspartner aus der Signaltransduktion liefert die Tab. 3.

**Tab. 3: Die ZO-Proteine und ihre Interaktion mit Proteinen aus der Signaltransduktion und Zellproliferation.**

ZO-Protein	Bindungspartner	Funktion	Referenz
ZO-1	ZONAB	Transkriptionsfaktor reguliert ErbB-2 Expression sowie Zellproliferation und Dichte über CDK4 Bindung.	(Balda und Matter 2000; Balda et al. 2003; Sourisseau et al. 2006)
	APG-2	Reguliert die Interaktion mit ZONAB.	(Tsapara et al. 2006)
	Proteinkinase C Isoformen $\delta, \theta, \lambda, \zeta$	Ko-lokalisieren mit ZO-1, regulieren TJ Aufbau	(Avila-Flores et al. 2001; Stuart und Nigam 1995)
	PI3K	Ko-lokalisieren mit ZO-1, regulieren TJ Aufbau	(Woo et al. 1999)
	P2AA	Induziert Dephosphorylierung von ZO-1, Occludin und Claudin-1.	(Nunbhakdi-Craig et al. 2002; Seth et al. 2007)
	AF-6	Stellt eine Verbindung zum Ras Transduktionsweg her.	(Yamamoto et al. 1997)
	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	Wachstumsfaktor senkt den TER und verringert die Anzahl der TJ Stränge.	(Schmitz et al. 1999)
ZO-2	Jun, Fos, C/EBP	Transkriptionsfaktoren	(Betanzos et al. 2004)
	<i>Scaffold attachment</i> Faktor-B (SAF-B)	Chromatin-Komponente	(Traweger et al. 2003)
	c-myc und Histondeacetylase	Regulieren Expression von Cyclin D1 einem Zellzyklusregulator	(Huerta et al. 2007)
	PKC $\beta, \lambda, \epsilon, \zeta$	Kinasen phosphorylieren ZO-2	(Avila-Flores et al. 2001)
ZO-3	p120, Catenin, AF-6	Beeinflusst RhoA Aktivität und Zellmotilität	(Wittchen et al. 2003)



### 1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Ausbildung von Zellkontakten in Epithel- und Endothelzellen bedürfen der räumlichen und zeitlichen Regulation, um Prozesse der Zellteilung zu ermöglichen und trotzdem einen wirkungsvollen Schutz der Organe vor dem Eindringen von Toxinen zu gewährleisten. Diese Aufgabe erfordert die Koordination einer großen Anzahl von Proteinen. Membranproteine, wie Claudine können z. B. in TJ-losen Zellen Zellkontakte und Stränge ausbilden. Sie lokalisieren jedoch nicht unabhängig von anderen TJ-Proteinen im lateralen Bereich der Plasmamembran. ZO-1 ist ein Protein, dessen Lokalisation zeitlich das Entstehen der Zellkontakte begleitet. Es interagiert mit Proteinen der *Tight junction* (TJ), *Adherens junctions* und *Gap junction*. Durch die Untersuchung der Interaktion der proteinbindenden Domänen von ZO-1 mit Zellkontaktproteinen und die Regulation dieser Bindungen soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der Organisation und Funktion der Zellkontakte geleistet werden.

ZO-1 verfügt über PDZ-Domänen, die mit Membranproteinen der Zellkontakte interagieren. Die Interaktion erfolgt an die C-Termini der Membranproteine. Mit der Analyse von Peptidbibliotheken und Proteomuntersuchungen an Epithelzellen sollen neue Bindungspartner der PDZ-Domänen identifiziert werden.

ZO-1 ist ein Zielprotein für Kinasen. Phosphorylierungsstellen innerhalb der PDZ-Domänen von ZO-1 sollen identifiziert werden. Ortsspezifische Mutagenese von phosphorylierbaren Aminosäuren innerhalb der PDZ-Domänen soll den Einfluss der Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten an Zellkontaktproteine aufzeigen.

Die PDZ 2-Domäne von ZO-1 interagiert mit sich selbst. In der Kristallstruktur der PDZ 2-Domäne zeigt sich ein einzigartiger Oligomerisierungsmechanismus. Die Interaktion soll in lebenden Zellen mit Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer untersucht werden. Es wurde postuliert, dass bei der Ausbildung des Dimers ein Histidin in der PDZ 2 Domäne eine Rolle spielen könnte. Durch Austausch dieser Aminosäure mit ortsspezifischer Mutagenese soll ihr Beitrag zur Selbstinteraktion geklärt werden.

Die SH3-hinge-GuK-Einheit von ZO-1 interagiert mit dem TJ-Protein Occludin. In einem Modell wird als Voraussetzung für die Interaktion die Oligomerisierung der beiden Proteine gefordert. Ein Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle Charakterisierung der Interaktion der interagierenden Domänen der beiden Proteine. Dazu sollen die Domänen rekombinant exprimiert und auf ihre Oligomerisierungsfähigkeit untersucht werden. Methodisch soll die Charakterisierung mit Lichtstreuung, Zirkulärer-Dichroismus Spektroskopie und Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie erfolgen. Die Bindung von ZO-1 an Occludin soll ebenfalls *in vitro* untersucht werden.

Die Untersuchungen sollen Ansatzpunkte liefern, wie die Interaktion und Zusammensetzung der Zellkontakte beeinflusst werden kann. Sie schaffen eine Grundlage, Interaktionen in der Zelle zu manipulieren und so die Dichtheit von Gewebebarrieren wie z.B. der Blut-Hirn-Schranke zu modifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

In den Tabellen 4-10 wurden die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Zellkulturen sowie Materialien und Geräte aufgelistet. Als Wasser wurde entweder einfach destilliertes oder doppelt destilliertes (ddH<sub>2</sub>O) und filtriertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 18 Ω verwendet.

**Tab. 4: Chemikalien**

Hersteller	Chemikalien
Berkel-AHK, Berlin, Deutschland	Ethanol, unvergällt
Biacore AB, Uppsala, Schweden	Glycerin
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	200 mM L-Glutamin, Phosphatpuffer (PBS), Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml/10000 U), DMEM Medium
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	Ammoniumperoxodisulfat (APS), Magermilchpulver; Tetramethylethylendiamin (TEMED), Glycin
Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA	L-Arginin [ <sup>13</sup> C], L-Lysin [ <sup>13</sup> C]
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Acryl-/Bisacrylamid-Mix (30%/ 0,8%), Agar-Agar, Ampicillin-Natriumsalz, Bromphenolblau, 1,4-Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Ethidiumbromid, α-D(+)-Glukose Monohydrat, Glycerin, Hefeextrakt, Imidazol, Isopropyl-β-D-thiopyranosid (IPTG), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumfluorid (KF), Kanamycin-Sulfat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> ), Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ), D(+)-Maltose Monohydrat, Natriumacetat; Natriumfluorid (NaF), Pepton aus Casein, D(+)-Saccharose; Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan, Wasser HPLC rein
Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland	100 bp DNA-Marker (GeneRuler™), 1 kb DNA-Marker (GeneRuler™), dNTP's, Protein-Molekulargewichtsmarker #SM0431
Fluka, Steinheim, Deutschland	Coomassie™ Brilliant Blue G250, Perchlorsäure
Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland	<sup>32</sup> P markiertes ATP
IBA, Göttingen, Deutschland	Strep-Tactin Sepharose Suspension 50%, Proteinreinigungspuffer-Set
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	DMEM/HAEMS F12 (SILAC), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Lipofectamine™ 2000, OptiMem, SeeBlue Plus 2 Prestained Marker
J.T. Baker, Deventer, Holland	Aceton, Acetonitril, Formaldehyd, Isopropanol, Methanol, Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid (NaOH)
Merck Biosciences Ltd., Darmstadt, Deutschland (auch Calbiochem)	Essigsäure, Di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat (Tween 20), Silbernitrat, Trifluoressigsäure
PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich	Fötales Kalbserum (FCS) Gold
Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland	BSA Standard, BCA Assay, SuperSignal West Pico Luminol
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Proteaseinhibitorcocktail für Eukaryoten ohne EDTA, PhosStop Phosphataseinhibitorcocktail

## Material und Methoden

Hersteller	Chemikalien
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Agarose; Glycin; Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Ammoniumhydrogencarbonat
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Adenosintriphosphat (ATP), Albumin aus Rinderserum (BSA), Ammoniumhydrogencarbonat, Blocking Buffer 10x (B6429), Dimethylsulfoxid (DMSO), 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC), Ethanolamin, L-Glutathion reduziert, Glutaraldehyd, Glutathion-Agarose, $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure, HEPES, 2-Mercaptoethanol, Natriumazid, N-Hydroxysuccinimid (NHS), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Paraformaldehyd, Poly-L-Lysin, Ponceau S, Proteaseinhibitorcocktail für Bakterien, Thioharnstoff, Triton <sup>®</sup> X-100, Trizma <sup>®</sup> -base, 4-Vinyl-Pyridin, L-Arginin [ <sup>12</sup> C], L-Lysin [ <sup>12</sup> C], Bradford Reagenz
VEB Laborchemie, Apolda, DDR	Borsäure
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Dimethylsulfoxid (DMSO, cell culture quality)

**Tab. 5: Zusammenstellung der Enzyme und Kits**

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	<i>ECL Western blotting detection reagents</i> , LMW Gel Filtration <i>Calibration Kit</i> ,
BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland	<i>BD Advantage 2</i> Polymerase Mix, <i>BD Advantage 2</i> PCR-Puffer, pECFP- <sup>N</sup> / <sub>C</sub> 1 und pEYFP- <sup>N</sup> / <sub>C</sub> 1
Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland	DpnI, XhoI, Sall, Mikrokokkus Nuklease
Merck, Calbiochem, Novagen Darmstadt, Deutschland	Benzonase, LIC Cloning Kit für pTriEX-6 3C/LIC Vektor, Protein Kinase C Isozym Sampler Kit, PK <i>Ciota</i> GST (539685), PK <i>Alpha</i> His (539651)
New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland	FaktorXa
Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	Trypsin – sequencing grade
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Spin Miniprep Kit, MiniElute Gelextraction Kit
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Endoproteinase ArgC (Sequencing Grade), Chymotrypsin (Sequencing Grade)
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Thrombin
Zymoresearch Corp., San Francisco, USA	Zippy Plasmid Miniprep Kit

**Tab. 6: Materialien und Geräte**

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	Nitrocellulose Hybond ECL Membran, Phosphoscreen, PVDF Hybond-P, HiPrep 26/10 Entsalzungssäule, <i>Tricorn Superdex75</i> 10/300 GL, <i>Mighty Small II</i> SE250/SE260 (Hoefer),
Avestin Europe GmbH, Mannheim, Deutschland	Emulsi Flex-C3 Homogenizer
Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland	Ultraschallbad Sonorex RK 52H
Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Spektrometer DU 640, pH-Meter Phi 32
BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland	Sterilwerkbank S-1200
Biacore AB, Uppsala, Schweden	Biacore 2000, Sensor Chip CM5 und CM4
Binder GmbH, Tüftlingen, Deutschland	Zellinkubator CB210
Bioblock scientific, Frenkendorf, Schweiz	Ultraschall Gerät Duty cycle
Biomedis Laborservice, Gießen, Deutschland	Autoklav FVSI 2 4.0

Material und Methoden

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland	Agarosegelkammer Agagel Mini, Geldokumentationsgerät BioDoc CCD Kamera
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	BioRad Trans-blot SD Transferzelle, Filterpapier, Bio Logic LP und <i>BioFrac Fraction Collector</i> , Software LP Data view, PCR Thermocycler DNA Engine
Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland	Lumi-Imager F1
Bühler, Tübingen, Deutschland	Schüttelinkubator TH5
Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland	LSM 510 META-UV, LSM 510 META-NLO
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Dialysemembran 5000 Da, Mikro-Dialysierkapsel QuixSep, Parafilm <sup>®</sup> M,
Du Pont de Nemours Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland	Sorval Evolution RC285 Zentrifuge mit SS34 Rotor
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Zentrifugen 5415C und 5810R, Thermomixer 5436
EquiBio / Thermo Electron, Milford, MA, USA	Elektroporator Easyject prima
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	Gewebekulturflaschen Cellstar 75 cm <sup>2</sup> , Flachboden transparent Kulturplatten mit 96 Löchern, Gewebekulturplatten 35x10 mm
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Schüttler Polymax 2040
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Xcell Sure Lock <sup>™</sup> Mini Cell, Novex Tris/Glycin Gradientengele 4-20% Acrylamidanteil
Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland	J-720 Spektropolarimeter
Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe, Deutschland	Q-TOF Fläschchen, Septum, Deckel
Mettler Toledo, Gießen, Deutschland	pH-Meter MP225
Microcal Europe, Milton Keynes, GB	Isothermales Titrationskalorimeter VP-ITC
Micromass, Manchester, Großbritannien	Massenspektrometer Q-TOF Ultima, Quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer
Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland	Amicon Ultra-15 (5000 MWCO), Wasseraufbereitungsanlage, Microcon YM 30 MW cut off 30000 Da
Mobitec GmbH, Göttingen, Deutschland	Mobicol Mini Zentrifugationssäulchen
Molecular Dynamics Inc. Sannyvale, CA, USA	Phosphoimager Storm 830 Imager, Phospho- image screen
New England BioLabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland	Amylose Resin
Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA	Filtereinheiten Nanosep 10 kDa
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	1 mm Elektroporationsküvette
Perbio Science Deutschland, Bonn, Deutschland	5 ml Säulen Handee <sup>™</sup> Centrifuge Columns
Perseptive Biosystems, Inc., Framingham, USA	Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF Massenspektrometer, Probenplatte
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Ni-NTA Sepharose
Sartorius, Göttingen, Deutschland	Waagen, sterile Filter 0,2 µm und 0,45 µm
Sarvant Instruments, Farmingdale, NY, USA	Vakuumrotationsverdampfer Speed vac SC110 und ISS100
Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan	Pumpen LC10-AS, Entgaser DGU-14A, UV-Vis- Detektor SPD-10A, Steuerungseinheit CBM-10A, Fraktionskollektor FRC-10
Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland	Laser Millennia II
Stuart Scientific, Stone Staffordshire, UK	<i>Blood tube</i> Rotator SB1
Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland	Tecan SAFIRE Plattenleser
TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Deutschland	Gewebekulturschalen mit 24 Vertiefungen
Umax Systems GmbH, Willich, Deutschland	Scanner, Mirag II
Victor Recker, Berlin, Deutschland	Wasserbad GFL

Material und Methoden

Hersteller	Bezeichnung
Waters GmbH, Eschborn, Deutschland	Flüssigchromatographiesystem Kapillarsäule CapLC Atlantis dC <sub>18</sub> , 3 µm, 100 Å, 150 mm x 75 mm i.d.

Tab. 7: Antikörper

Name	Spezies	Katalognummer	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>			
Anti-Occludin-Antikörper	Kaninchen, 0,25 mg/ml, polyklonal	71-1500	Zymed-Laboratory/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Biotin	Maus, 1 mg/ml, monoklonal,	200-002-096	Dianova, Hamburg, Deutschland
<i>StrepMAB Classic HRP conjugate</i>	Maus, monoklonal	2-1509-001	IBA, Göttingen, Deutschland
<i>StrepMAB Classic</i>	Maus, monoklonal	2-1507-001	IBA, Göttingen, Deutschland
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Anti-Kaninchen-HRP HRP-Goat Anti Rabbit IgG	Ziege, 0,5 mg/ml,	00660748	Zymed-Laborator/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Maus-HRP HRP-Goat Anti Mouse IgG	Ziege	62-6520	Zymed-Laborator/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 8: Bakterienstämme und eukaryotische Zellkulturen

Bakterienstämme	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) DH5α <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> Φ80dlacZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>E. coli</i> NovaBlue Singles	<i>endA1 hsdR17</i> (rK12– mK12+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F</i> [ <i>proA+B+ lacIqZDM15::Tn10</i> ] (TetR)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> ER2566	F- λ- <i>fhuA2</i> [ <i>lon</i> ] <i>ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ</i> ( <i>mcrC-mrr</i> )114::IS10 R( <i>mcr-73::miniTn10-TetS</i> )2 R( <i>zgb-210::Tn10</i> )(TetS) <i>endA1 [dcm]</i>	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	(Studier et al. 1990)
<i>E. coli</i> OrigamiB(DE3) pLacI	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB pLacI</i> (CamR, KanR, TetR)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<b>Eukaryotische Zellen</b>		
Normale Ratten Cholangiozyten	NRC	(Weksler et al. 2005)
Humane embryonale Nierenzellen 293	HEK 293	American Type Culture Collection Manassas, USA Nr. ATCC-CRL-1573

**Tab. 9: Plasmide und Proteinsequenzen von Occludin und Zonula Occludens -1 (ZO-1)**

Die Aminosäureangaben beziehen sich bei Occludin und ZO-1 auf die murine Sequenz. Die Proteine mit der Referenz S. Müller und M. S. Bal wurden aus humaner cDNA amplifiziert (GenBank/EMBL NM\_003257). Die Sequenzen von muriner und humaner ZO-1 DNA weichen an zwei Positionen in der SH3-*hinge*-GuK Region von einander ab. Das murine Leucin in Position L676 entspricht in der humanen Sequenz dem Prolin 644 und das murine Histidin 683 entspricht Glutamin 671. Die Größe wurde für das Protein mit Affinitätsanhang angegeben.

Protein Domäne	Aminosäureposition	Struktureinheiten	Größe (kDa)	Plasmid	Fusion	Referenz
<b>Occludin</b>						
MBP-Occ C	406-521	C-terminale <i>coiled-coil</i> -Domäne	57	pMAL-c2x	MBP	A. Schmidt
GST-Occ C	406-521	C-terminale <i>coiled-coil</i> -Domäne	40	pGEX-4T1	GST	S. Müller
His-Occ C	406-521	C-terminale <i>coiled-coil</i> -Domäne	18	pET-28a	6xHis	S. Müller
<b>ZO-1</b>						
SH3	502-576+631-645	SH3+ $\beta_D$	54	pMAL-c2x	MBP	S. Müller
SH3- <i>hinge</i>	502-645	SH3+ cc1	58,8	pMAL-c2x	MBP	S. Müller
GuK	644-772	GuK+cc2a	58	pMAL-c2x	MBP	A. Schmidt
<i>hinge</i> -GuK	589-772	cc1+GuK+cc2a	64	pMAL-c2x	MBP	A. Schmidt
SH3- <i>hinge</i> -GuK I	502-812	SH3 cc1, cc2a, cc2b+ $\beta F$	79	pMAL-c2x	MBP	A. Schmidt
SH3- <i>hinge</i> -GuK II	516-806	SH3, cc1, cc2a, cc2b+ $\beta F$	76,6	pMAL-c2x	MBP	M.S. Bal

**Tab. 10: Petide von ZO-1**

Alle Zonula Occludens -1 Peptide wurden in der Arbeitsgruppe Peptidchemie von Dr. M. Beyermann synthetisiert.

Peptidname	Aminosäurenposition	Sequenz	Molekulargewicht [g/mol]
<b>ZO-1</b>			
Helix 2 (H2)	747-770	SRKSARKLYERSHKLRKNNHHLFT	3006,5
Biotin H2	747-770	Biotin-SRKSARKLYERSHKLRKNNHHLFT	3250,8
<i>coiled-coil</i> 1 (cc1)	597-624	DRADFWRFRGLRSSKRNLKRSREDLSAQ	3450,9
Biotin cc1	597-624	Biotin-DRADFWRFRGLRSSKRNLKRSREDLSAQ	3695,2
<b>Kontrollen</b>			
NOS		Biotin-KRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQAMA	3095,8
CRF		SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQ AHSNRKLLDIA	4616,3

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

Plasmid-DNA wurde mit dem *Qiagen Mini Spin Kit* oder dem *Zippy DNA Extraktion Kit* nach Herstellerangaben präpariert und anschließend mittels Absorptionsmessung bei 260 nm die Konzentration bestimmt. Dabei wurde zugrunde gelegt, dass die durchschnittliche Absorption von 50 µg doppelsträngiger DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm einem Wert von 1 entspricht (Sambrook et al. 1989).

#### 2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten wurden 1-2%ige Agarosegele (w/v) mit 0,3 µg/ml (0,76 nM/ml) Ethidiumbromid in TAE (1 mM Essigsäure, 40 mM Tris pH 8,4, 1 mM NaEDTA) verwendet. Als Vergleichs-DNA wurde ein 100 bp DNA Marker oder 1 kb DNA-Marker (GeneRuler™) verwendet. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde bei 5 V/cm in einer Horizontalgelapparatur durchgeführt. Die Gele wurden mittels eines Gel-Dokumentationssystems fotografiert. Für die Elution und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *MiniElute Gelextraction Kit* von Qiagen verwendet. Dazu wurde die DNA-Bande unter UV-Licht ( $\lambda=254$  nm) aus dem Gel geschnitten, in ein Eppendorfggefäß überführt und entsprechend den Angaben des Herstellers verarbeitet. Die DNA wurde mit sterilem, HPLC reinem Wasser extrahiert.

#### 2.2.1.2 Sequenzierung

Plasmide wurden mit dem *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* sequenziert. Die PCR wurde mit 200-400 ng Plasmid DNA mit 5x Sequenzierpuffer (Endkonzentration 80 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub> steril filtriert), 1 µM Oligonukleotide sowie 1 µl *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* Reagenz in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Anschließend wurde der Sequenzieransatz mit 112,5 mM Natriumacetat pH 4,6 und 76% Ethanol (v/v) in HPLC reinem Wasser gefällt. Die DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet 20 min im Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte durch das Sequenzierlabor am FMP bzw. durch Invitak GmbH (Berlin, Deutschland). Sequenzierprimer sind in Tab. 11 enthalten.

**Tab. 11: Oligonukleotide zur Sequenzierung von Zonula Occludens-1**

Die Nomenklatur der Primer setzt sich aus dem Proteinnamen und der ersten Base in der Sequenz im DKFZ Klon p686A1195Q mit der das Oligonuklotid beginnt, zusammen. Die Abkürzungen rv rückwärts (3'nach 5') und fw vorwärts (5'nach 3') stehen für die Sequenzrichtung. Der T7 Promotorprimer bindet an den T7 Promotor in der Plasmidsequenz.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz von 5'nach 3'
Seq ZO1 429 rv	gccgagggatagaagtgc
Seq ZO1 1434 rv	cctaaaggagaagaagtgacc
Seq ZO1 1899 fw	ggttctcgagaagctgga
Seq ZO1 1935 rv	gctggcaagagaagaacc
Seq ZO1 2444 fw	cctacctgtcagctccagg
Seq ZO1 2958 fw	gcgatacgaagatcgcg
Seq ZO1 3460 fw	ccactgcctccccc
Seq ZO1 3967 fw	ggcgagaaacgctatg
Seq ZO1 4467 fw	gcctcctgagttgacag
T7 Promotor	taatacgactcactataggg

### 2.2.1.3 Transfektion in *Escherichia Coli*

Zur Transfektion in unterschiedliche *E. coli* Stämme wurden elektrokompetente Bakterien, wie in *Current Protocols in molecular biology* (Ausubel et al. 2002) beschrieben, hergestellt. Die Transformation erfolgte im Easyject prima mit 1800 V in 1 mm Elektroporationsküvetten. Die Zellen wurden in 250 µl SOC Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 50-100 µl der Zellsuspension auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.1.4 Anlegen von Minikulturen

Eine Kolonie von einer Agarplatte wurde in 5-20 ml Luria Bertani (LB) Medium (1% (w/v) Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 85 mM NaCl) mit dem passenden Antibiotikum mit einem sterilen Zahnstocher überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler angezogen. Mit der Minikultur wurde entweder eine Kultur im Expressionsmaßstab inokuliert, eine Plasmidpräparation durchgeführt, oder eine Glycerinkultur angelegt. Die Tab. 12 enthält die Plasmide und die dazugehörige Antibiotikaresistenz sowie die Endkonzentration des Antibiotikums im Medium. Kulturen von *E. coli* OrigamiB(DE3)pLacI wurde zusätzlich 15 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

**Tab. 12: Plasmide und Antibiotikaresistenzen**

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Endkonzentration des Antibiotikums im Medium
pMal-c2x	Ampicillin	100 µg/ml
pTriEx-6	Ampicillin	50 µg/ml
pET-28a	Kanamycin	30 µg/ml
pGex-4T-1	Ampicillin	100 µg/ml

### 2.2.1.5 Lagerung der Stämme

Bakterien aus einer Minikultur wurde 10% (v/v) autoklaviertes Glycerin beigemischt. Die Glycerinkultur wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2 Erzeugung der Deletionsmutanten von Zonula Occludens-1

Die ZO-1 Abschnitte wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der *BD Advantage 2 Polymerase Mix* Polymerase erzeugt. Als Vorlage diente der Klon DKFZp686A1195Q2 vom deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung. Er kodiert für die humane  $\alpha$  Splicingvariante von ZO-1 und entstammt der Retina. Das PCR Programm ist in Tab. 13 angegeben.

**Tab. 13: PCR Programm für die Amplifikation der Zonula Occludens-1 Abschnitte**

Temperatur	Zeit in Minuten	Wiederholungen	
94°C	05:00	1	Anfangsdenaturierung
94°C	00:40	27	Denaturierung
60°C	00:40	27	Oligonukleotidanlagerung
68°C	01:00 05:00	27	Extension für PDZ-Domänen für längere Fragmente
68°C	07:00	1	Endextension

Im Ansatz waren enthalten: 1x *BD Advantage 2* PCR-Puffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 ng Plasmid DNA, je 0,1 µM Oligonukleotide, 0,4 mM je dNTP und 1x *Advantage 2 Polymerase Mix* Polymerase in ddH<sub>2</sub>O.



Zur Generierung neuer Deletionsmutanten von ZO-1 wurde das ligaseunabhängige Klonierungssystem pTriEx-6 3C/LIC verwendet. Die Klonierung resultierte in Deletionsmutanten die N-terminal ein Strep-tag II und C-terminal ein His-tag kodierten. Durch ein zusätzliches Stoppkodon im Oligonukleotid entstanden auch Deletionsmutanten ohne His-tag. Die Klonierung wurde nach den Angaben des Herstellers (Novagen TB453) mit jeweils der Hälfte des empfohlenen Materials durchgeführt. Alle erzeugten Deletionsmutanten und Oligonukleotide sind in Tab. 14 zusammengefasst. Die Plasmide lagen anschließend im *E. coli* Stamm *Nova Blue GigaSingle* vor.

**Tab. 14: Oligonukleotide für die Erzeugung neuer Zonula Occludens-1 Fragmente**

Die Spalte 1 enthält die Benennung der ZO-1 Deletionsmutanten. In Spalte 2 sind die Namen der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die Oligonukleotidsequenz ist in Spalte 3 angegeben. Klein-geschriebene Buchstaben repräsentieren Basen die zu ZO-1 (DKFZp686A1195Q2) komplementär sind. Großgeschriebene Basen enthalten den Teil der komplementär zur Matrizen-DNA ist und ein eventuell eingefügtes Stoppcodon.

Domäne/ Name	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz von 5' nach 3'	AS bezogen auf DKFZp686A1195Q2
PDZ 1_A	ZO1_MERN_f ZO1_VSRP_r	CAGGGACCCGGTatggagagaaatacgttttc GGCACCAGAGCGTtaggacggcttactgg	1-103
PDZ 1_B	ZO1_MEET_f ZO1_VSRP_r	CAGGGACCCGGTatggaggaaacagctatatg GGCACCAGAGCGTtaggacggcttactgg	17-103
PDZ 1_C	ZO1_HRAP_f ZO1_VSRP_r	CAGGGACCCGGTcacagggtcctcctgg GGCACCAGAGCGTtaggacggcttactgg	31-103
PDZ 1_D	ZO1_IWEQ_f ZO1_RRKK_stop	CAGGGACCCGGTatatgggaacaacatacag GGCACCAGAGCGTTTTActtcttctcctc	22-114 ohne His•tag
PDZ 1	PDZ1_Tri_f PDZ1_Tri_r	CAGGGACCCGGTgtgacgcttcacagg GGCACCAGAGCGTtaacagcaaagcatgttc	28-96
PDZ 2_A	ZO-1_PAKP_f ZO1_ERAT_r	CAGGGACCCGGTcctgctaaacctactaaag GGCACCAGAGCGTtagcgtagcccgttc	185-273
PDZ 2_B	ZO-1_PAKP_f ZO1_TLLN_r	CAGGGACCCGGTcctgctaaacctactaaag GGCACCAGAGCGTtagggacattcaatagcgt	185-277
PDZ 2_C	ZO-1_PAKP_f PDZ2_Tri_r	CAGGGACCCGGTcctgctaaacctactaaag GGCACCAGAGCGTtaagatcagggacattc	185-279
PDZ 2_C stop	ZO-1_PAKP_f ZO1_VPDL_stop_r	CAGGGACCCGGTcctgctaaacctactaaag GGCACCAGAGCGTTTTAagatcagggacattc	185-279 ohne His•tag
PDZ 2_D	ZO1_RKNE_f ZO1_ERAT_r	CAGGGACCCGGTcggaaaatgaagaatatgg GGCACCAGAGCGTtagcgtagcccgttc	197-273
PDZ 2_E	ZO1_RKNE_f ZO1_TLLN_r	CAGGGACCCGGTcggaaaatgaagaatatgg GGCACCAGAGCGTtagggacattcaatagcgt	197-277
PDZ 2_F	ZO1_RKNE_f PDZ2_Tri_r	CAGGGACCCGGTcggaaaatgaagaatatgg GGCACCAGAGCGTtaagatcagggacattc	197-279
PDZ 2_G	PDZ2_Tri_f ZO1_ERAT_r	CAGGGACCCGGTaaagtcacactggtg GGCACCAGAGCGTtagcgtagcccgttc	190-273
PDZ 2_H	PDZ2_Tri_f ZO1_TLLN_r	CAGGGACCCGGTaaagtcacactggtg GGCACCAGAGCGTtagggacattcaatagcgt	190-277
PDZ 2_I	ZO1_PAKP_f ZO1_QRDE_stop_r	CAGGGACCCGGTcctgctaaacctactaaag GGCACCAGAGCGTTTTAttcatctcttgaac	185-270 ohne His•tag
PDZ 2	PDZ2_Tri_f PDZ2_Tri_r	CAGGGACCCGGTaaagtcacactggtg GGCACCAGAGCGTtaagatcagggacattc	190-279
PDZ 3_A	ZO1_DSVG_f ZO1_KKGD_r	CAGGGACCCGGTtagatagtgtgggttgc GGCACCAGAGCGTtatccttcttctgagc	435-509
PDZ 3_B	ZO1_DSVG_f PDZ3_Tri_r	CAGGGACCCGGTtagatagtgtgggttgc GGCACCAGAGCGTtctgagccaatatggtcac	435-505
PDZ 3_C	ZO1_RPSM_f ZO1_KKGD_r	CAGGGACCCGGTcggcccagcatg GGCACCAGAGCGTtatccttcttctgagc	423-509
PDZ 3_D	ZO1_RPSM_f PDZ3_Tri_r	CAGGGACCCGGTcggcccagcatg GGCACCAGAGCGTtctgagccaatatggtcac	423-505

Domäne/ Name	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz von 5' nach 3'	AS bezogen auf DKFZp686A1195Q2
PDZ 3_E	ZO1_RPSM_f ZO1_KKGD_stop_r	CAGGGACCCGGTcggcccagcatg GGCACCAGAGCGTTTTAatccttcttctgagc	423-509 ohne His-tag
PDZ 3_F	ZO1_ILRP_f ZO1_LAQK stop-r	CAGGGACCCGGTattcttcggcccagc GGCACCAGAGCGTTTTActtctgagccaatatggtc	420-505
PDZ 3	PDZ3_Tri_f(SMKL) PDZ3_Tri_r(VTIL)	CAGGGACCCGGTagcatgaaattggtaaaattc GGCACCAGAGCGTTctgagccaatatggtcac	425-505
PDZ 1- 3_A	ZO1_IWEQ_f ZO1_KKGD_r	CAGGGACCCGGTatatgggaacaacatacag GGCACCAGAGCGTTatccttcttctgagc	22-509
PDZ 1- 3_B	ZO1_IWEQ_f ZO1_KKGD stop_r	CAGGGACCCGGTatatgggaacaacatacag GGCACCAGAGCGTTTTAatccttcttctgagc	22-509 ohne His-tag
PDZ 1- 3_C	ZO1_IWEQ_f ZO1_LAQK stop-r	CAGGGACCCGGTatatgggaacaacatacag GGCACCAGAGCGTTTTActtctgagccaatatggtc	22-505
PDZ 1- AR	PDZ1_Tri_f Ar_Tri_r	CAGGGACCCGGTgtgacgcttcacagg GGCACCAGAGCGTTatatgtttggtttcatgatgc	17-899
PDZ 2- AR	PDZ2_Tri_f Ar_Tri_r	CAGGGACCCGGTaaagtcacactggtg GGCACCAGAGCGTTatatgtttggtttcatgatgc	190-899
PDZ 3- AR	PDZ3_Tri_f Ar_Tri_r	CAGGGACCCGGTagcatgaaattggtaaaattc GGCACCAGAGCGTTatatgtttggtttcatgatgc	425-899
PDZ 1- ShG_A	ZO1_MERN_f ZO1_GATS_r	CAGGGACCCGGTatggagagaaatacgttttc GGCACCAGAGCGTTctgtagcaccatcc	1-815
PDZ 1- ShG_B	ZO1_MEET_f ZO1_GATS_r	CAGGGACCCGGTatggaggaaacagctatatg GGCACCAGAGCGTTctgtagcaccatcc	17-815
PDZ 2- ShG_A	ZO1_PAKP_f ZO1_GATS_r	CAGGGACCCGGTcctgctaaacctactaaag GGCACCAGAGCGTTctgtagcaccatcc	185-815
PDZ 2- ShG_B	PDZ2_Tri_f ZO1_GATS_r	CAGGGACCCGGTaaagtcacactggtg GGCACCAGAGCGTTctgtagcaccatcc	190-815
PDZ 3- ShG_A	ZO1_RPSM_f ZO1_GATS_r	CAGGGACCCGGTcggcccagcatg GGCACCAGAGCGTTctgtagcaccatcc	423-815
PDZ 3- ShG_B	PDZ3_Tri_f ZO1_GATS_r	CAGGGACCCGGTaaagtcacactggtg GGCACCAGAGCGTTctgtagcaccatcc	425-815
ZO-1	ZO1_MEET_f ZO1end_r	CAGGGACCCGGTatggaggaaacagctatatg GGCACCAGAGCGTTaaagtggtcaataagg	17-1692
ZO-1	ZO1_MERN_f ZO1end_r	CAGGGACCCGGTatggagagaaatacgttttc GGCACCAGAGCGTTaaagtggtcaataagg	1-1692

### 2.2.3 Ortsspezifische Mutagenese

Um Aminosäuren in der PDZ 1 oder PDZ 2-Domäne auszutauschen, wurde eine modifizierte *Quick-change Mutagenese* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

**Tab. 15: Zusammensetzung des Mutageneseansatzes**

Menge	Zusammensetzung
0,5 µl	Plasmid-DNA (60 ng)
1,5 µl	10x PCR-Reaktionspuffer
1,9 µl	Primer (vor- oder rückwärts)
0,3 µl	dNTPs
10,5 µl	H <sub>2</sub> O (HPLC rein)
0,3 µl	Advantage <sup>TM</sup> 2 Polymerase
15,0 µl	Gesamtvolumen

Mittels eines komplementären Primerpaares (Tab. 17) welches die gewünschte Mutation enthielt und ansonsten mit der Sequenz der PDZ-Domäne hybridisierte, wurde ein Basenaustausch eingeführt. In der PCR wurde das gesamte Plasmid inklusive der veränderten Sequenz im Anschluss amplifiziert (Tab. 16). Als Grundlage dienten die Plasmide pTriEx6 mit PDZ 1\_D und PDZ 2\_I. Der Ansatz ist Tab. 15 zu entnehmen. Im Syntheseschritt 1 wurde nur ein Primer zu dem Plasmid gegeben und fünf

Zyklen lang amplifiziert. Danach wurden die Ansätze vereinigt und 0,3 µl Polymerase zugegeben. Der Ansatz mit beiden Primern wurde weitere 17 Zyklen amplifiziert. Die aus Bakterien stammende unmodifizierte Plasmidvorlage lag methyliert vor. Diese Modifikation wurde ausgenutzt, um mit dem Enzym DpnI, welches methylierte DNA verdaut, die Vorlagen DNA abzubauen. Der Verdau erfolgte mit 10 U DpnI für 16 h bei 37°C. 3 µl der Ansätze wurden in 50 µl *E. coli* DH5α transformiert (s.2.2.1.3).

**Tab. 16: Polymerasekettenreaktionsprogramm für die ortsspezifische Mutagenese**

Im ersten Syntheseschritt wurde das Plasmid mit einem der beiden komplementären Primer amplifiziert. Für den zweiten Syntheseschritt wurden Ansätze mit komplementären Primern vereinigt.

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
<b>Syntheseschritt 1</b>		
1	95 °C	2 min
5	95 °C	30 s
	65 °C	45 s
	68 °C	10 min
1	10 °C	∞
<b>Syntheseschritt 2</b>		
1	95 °C	30 s
17	95 °C	30 s
	62,5 °C	1 min
	68 °C	10 min
1	68 °C	20 min
1	4 °C	∞

**Tab. 17: Oligonukleotide zur Mutagenese der PDZ 1 und 2-Domäne**

Der Name gibt durch den ersten Buchstaben die Aminosäure und durch die Zahl ihre Position in der ZO-1 Sequenz von Klon DKFZp686A1195Q2 an. Es folgt die Aminosäure, die substituiert wurde. Die veränderten Basenpaare in der Oligonukleotidsequenz sind kursiv gesetzt.

Name/ Mutation	Name der Primer	Oligonukleotidsequenz von 5' nach 3'
PDZ 2 H209G	ZO-1 P2 H193G fw ZO-1 P2 H193G rv	ggtcttcgattggcaagcGGtatattgttaagg ccttaacaatatataCCgcttgccaatcgaagacc
PDZ 1 S43E	P1_S43E_f P1_S43E_r	ggatttgaattgcaataGAGggtggacgagataatcc ggattatctcgtccaccCTCtattgcaattccaaatcc
PDZ 1 S53E	P1_S53E_f P1_S53E_r	ggacgagataatcctcattttcagGAGggggaaacgctc gacggttccccCTCctgaaaatgaggattatctcgtcc
PDZ 1 S102E	P1_S102E_f P1_S102E_r	ttgctgttcagcaactaaggaaaGAGgggaaaaatgca tgcatTTTTCCCCTCtttcttagttgctgaacagcaa
P1 T109E	P1_T109E_f P1_T109E_r	agtgggaaaaatgcaaaaattGAAattagaaggaagaag cttctccttctaattTTCaattttgcatTTTTCCCact
PDZ 2 T192E	P2_T192E_f P2_T192E_r	cctgctaaacctactaaagtcGAActggtgaaatccc gggatttcaccagTTCgacttttagtaggttagcagg
PDZ 2 Y202E	P2_Y202E_f P2_Y202E_r	gaagaaGAGgtcttcgattggcaagcc ggcttgccaatcgaagacCTCttcttc
PDZ 2 S208E	P2_S208E_f P2_S208E_r	ggtcttcgattggcaGAGcatatattgttaagg ccttaacaatatatgCTCtgccaatcgaagacc
PDZ 2 T239E	P2_T239E_f P2_T239E_r	ggtgatgtgtattgaagataaatggtGAGgtgacag ctgtcacCTCaccattatcttcaatacaacatcacc
P2 T247E	P2_T247E_f P2_T247E_r	gtcattgGAAGatgcaagacattgatagaaagg cctttctatcaatgtctttgcatcTTCcaatgac
P2 T251E	P2_T251E_f P2_T251E_r	gacagatgcaaagGAAttgatagaaaggctaaaggc gccttagacctttctatcaaTTCctttgcatctgtc

## **2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1 Standardmethoden der Proteinbiochemie**

Die Hitzesterilisation erfolgte für 2 h bei 180°C oder im Autoklaven bei 1,5 bar für 21 min bei 121°C. Die Proteinkonzentrationen wurden im Photometer bei 280 nm gemessen und nach dem Lambert Beer'schen Gesetz berechnet. Als Referenz diente der Puffer in dem die Proteine gelöst waren. Der Extinktionskoeffizient wurde mit [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch) bestimmt. Für Proteine, die eine Absorption bei 260 nm aufwiesen, die größer als die Hälfte der Absorption bei 280 nm war, wurde die Konzentration im Plattenleser mit der Bicinchoninsäure (BCA) Methode nach Anleitung des Herstellers (Pierce) bzw. mit der Methode von Bradford (Sigma) bestimmt. Als Vergleichsprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

### **2.3.2 Bakterielle Expression**

Für die bakterielle Proteinexpression wurden sterile Kolben mit autoklaviertem RM-Medium befüllt. Dem Medium wurden die entsprechenden Antibiotika (s. Tab. 12) zugesetzt. 400 ml Medium wurde mit 20 ml Minikultur beimpft und auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert bis eine Absorption bei 600 nm zwischen 0,6 und 0,8 erreicht war. Für die Expression von Proteinen aus den pMAL-c2x oder pTriEx Plasmiden wurde dem LB-Medium noch 0,2% Glukose (w/v) zugesetzt (RM-Medium). Zur Induktion der Expression wurden 300 mM IPTG zugegeben. Die Lagerung der IPTG Stammlösung erfolgte bei – 20°C. Die Bakterien wurden nach 2-3 h Expression auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 200 ml Suspension bei 3200 xg 10 Min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Medium wurde nach der Expression von PDZ-Proteinen durch resuspendieren der Bakterien in 50 ml kaltem 150 mM NaCl und 30-50 min Zentrifugation bei 3220 xg und 4°C entfernt. Die Pellets wurden bei 80°C gelagert. Für ausführliche Informationen zur Expression der PDZ-Domänen siehe auch Anhang PDZ.

#### **2.3.2.1 Testexpressionen**

Um die optimalen Bedingungen für die Proteinexpression zu finden, wurden die Plasmide in verschiedenen *E. coli* Stämmen bei unterschiedlichen Temperaturen und IPTG Konzentrationen auf ihre Expressionseffizienz getestet.

### **2.3.3 Zellaufschluß**

#### **2.3.3.1 mit Ultraschall**

Die Zellen wurden 4-6 Mal für 15 Sekunden (s) bei einem *Duty cycle* von 60% mit Ultraschall aufgeschlossen. Zwischen den Pulsen wurde 15 s pausiert. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen im Eisbad gekühlt. Die Zellextrakte wurden 2 min bei 4°C und ~20000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße von Zelltrümmern getrennt.

#### **2.3.3.2 mit Druck**

Die Bakterien aus 200 ml Kultur wurden in 20 ml kaltem Puffer W (IBA) resuspendiert. Die Zellen wurden im Homogenisator 5 min bei 1500 bar aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde 30 min bei 30000 xg und 4°C abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde zur Affinitätsreinigung genutzt oder bis zur Reinigung bei -80°C gelagert.

### **2.3.4 Affinitätschromatographische Reinigung der Proteine**

#### **2.3.4.1 Glutathion-S-Transferase- Fusionen**

Das Bakterienpellet aus der Expression wurde auf Eis aufgetaut und mit Proteaseinhibitor Cocktail (Endkonzentration 0,46 mM AEBSF; 2 mM NaEDTA; 0,04 mM Bestatin; 6 µM PepstatinA; 6 µM E-64) sowie 1,25 mM PMSF versetzt. Der Aufschluss erfolgte mit Ultraschall. Mit 25 U Benzonase wurde ein Nukleinsäureverdau für 30 min auf Eis durchgeführt. Die Suspension wurde für 10 min bei 20000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm Filter gereinigt. Das Lysat wurde an Glutathion-Agarose gebunden und mit TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 mM reduziertem L-Glutathion in TBS. Das Säulenmaterial wurde nach Herstellerangaben (Sigma) regeneriert. Die Reinigung erfolgte über eine LC-Anlage der Firma Biorad oder Handsäulen. Zur Spaltung von GST und Occ C wurde das immobilisierte Protein auf der Säule mit 100 U Thrombin in 1ml TBS über Nacht inkubiert. Die Elution des Occ C erfolgte mit TBS. Die Elution des GST erfolgte mit 10 mM reduziertem L-Glutathion in TBS.

#### **2.3.4.2 Maltosebindeprotein-Fusionen**

Die Reinigung der Maltosebindeprotein (MBP) -Fusionsproteine erfolgte analog zu 2.3.4.1. Die Affinitätsmatrix bestand aus Amylose-Agarose. Der Verdau mit Faktor Xa wurde nach Herstellerangabe (NEB) durchgeführt. Die Fusionsproteine oder MBP wurden mit 5 mM Maltose in TBS eluiert.

#### **2.3.4.3 Histidin-tag**

Die Reinigung des His-Fusionsproteins erfolgte über Ni-NTA Sepharose in PBS (pH 7,35) mit 10 mM Imidazol (pH 7,5) im Lysepuffer, 20 mM Imidazol (pH 7,5) im Waschpuffer und 300 mM Imidazol (pH 7,5) im Elutionspuffer (anlog 2.3.4.1). Dem Zelllysat wurde EDTA freier Proteaseinhibitor zugesetzt.

#### **2.3.4.4 Strep-Tag II-tag**

Die Reinigung erfolgte an Strep-Taktin-Sepharose nach dem Protokoll des Herstellers IBA mit dem Proteinreinigungspuffer-Set. Dafür wurde zum Equilibrieren des Säulenmaterials und Entfernen von ungebundenen Proteinen dreimal 5 ml Puffer W (100mM Tris-Cl pH 8,0 150 mM NaCl, 1mM EDTA) verwendet. Die Elution erfolgte in Puffer E, welcher aus Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin bestand.

### **2.3.5 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Analyse von Proteinproben wurden diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamidgele (PAA-Gele) gegossen (Sambrook et al. 1989). Die Proben wurden mit 0,2% SDS oder 2% SDS Puffer in Probenpuffer (10% Glycin, 33 mM Tris-HCl pH 6,8, Bromphenolblau) versetzt. Zur Reduzierung von Disulfidbrücken wurden 100 mM DTT zugesetzt. Die Proben mit 2% SDS und DTT wurden 5 min auf 95°C erhitzt. Als Größenstandard wurde *Unstained Protein Molecular Weight* Marker oder *Seebblue plus 2 Prestained* Marker verwendet. Je nach Größe der relevanten Proteine wurden die Trenngele mit einem PAA-Anteil zwischen 10% und 15% gegossen. Die Herstellung und Elektrophorese der Gele erfolgte mit dem System SE 260 (Hoefer). Tris/Glycin Gradientengele mit 4-20% PAA-Anteil wurden nach Protokoll von Invitrogen in einer Xcell Sure Lock™ Mini Cell bearbeitet. Proben für Proteomanalysen wurden mit 2% SDS und DTT im Puffer 5 min auf 60°C erhitzt.

### 2.3.6 Immuno-Blot (Western-Blot)

Die Proteine wurden zunächst gelelektrophoretisch getrennt (2.3.5) und anschließend aus dem Gel auf eine Nitrozellulose oder PVDF-Membran überführt. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran mit Wasser befeuchtet, die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch mit Methanol aktiviert. Zusammen mit zwei Stücken Filterpapier wurde die Membran in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 200 ml Methanol (99,9%)) gelegt. Das PAA-Gel wurde mindestens 5 min in Transferpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur durch Anlegen einer Spannung von 20 V für 30 bis 60 min. Die Membran wurde über Nacht in 3% (w/v) Milchpulver in TBST (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) blockiert. Der Immunologische Nachweis erfolgte bei Raumtemperatur mit einem primären Antikörper gegen das Protein in TBST für 2 h und einem sekundären Antikörper mit HRP-Konjugat in TBST für 1 h. Der Strep-tag wurde für 1 h mit einem HRP konjugierten primären Antikörper nachgewiesen. Zwischen den Inkubationsschritten wurde dreimal 5 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch *Western Blotting Luminol Reagent*-Lösung 1 und 2 benetzt und die Lumineszenz am *Lumi Imager* detektiert.

### 2.3.7 Peptidbibliothekbindungsanalyse

Um die Bindung der PDZ-Domänen an C-Termini verschiedener Proteine testen zu können, wurden Peptidbibliotheken von Proteinen auf Zellulosemembranen erstellt. Die Peptide umfassen die C-terminalen 11 Aminosäuren der Proteine und wurden mit dem N-Terminus auf der Zellulosemembran verankert (Boisguerin et al. 2004). Die Membranen wurden von Dr. P. Boisguerin und Dr. R. Volkmer zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchungen standen kleine Peptidbibliotheken mit maximal 51 ausgewählten Zellverbindungsproteinen sowie eine große humane Bibliothek mit Peptiden aus 6223 Proteinen zur Verfügung (Boisguerin et al. 2004). Die Peptidsequenzen der kleinen Bibliothek sind dem Ergebnisteil (Tab. 24) zu entnehmen. Die Membran wurde für 10 min in Ethanol aktiviert und dreimal mit Puffer W (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellulosemembranen mit Blockierungspuffer (Puffer W mit 10% *Blocking* Puffer enthält Casein (Sigma) und 5% (w/v) D(+)-Saccharose) für 3 h bei Raumtemperatur abgesättigt. 10 µg/ml der PDZ-Domäne wurden im Blockierungspuffer mit der Membran über Nacht im Kühlraum auf dem Schüttler inkubiert. Ungebundene PDZ-Domänen wurden durch dreimaliges Waschen in Puffer W entfernt. Gebundene PDZ-Domänen wurden mit dem Antikörper *StrepMAB Classic HRP conjugate* gegen den Strep-Tag II als 1:4000 Verdünnung im Blockierpuffer 1 h inkubiert. Nach abermaligem Waschen wurde der Antikörper mit *Western Blotting detection reagent* 1 und 2 oder *SuperSignal West Pico* Luminol sichtbar gemacht und mit dem *Lumi Imager* nach 1-10 min dokumentiert. Die Intensität der Chemilumineszenz wird in Boehringer Light Units (BLU) angegeben. Der Schwellenwert der BLU, ab dem ein Peptidpunkt detektiert als gebunden galt, wurde für PDZ 1 bei 100000 und für die PDZ 2 bei 79000 festgelegt.

Die kleinen Peptidbibliotheken wurden mit 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff und 1% SDS 10 min bei 50°C regeneriert und anschließend 3 mal 10 min in TBS Puffer gewaschen. Die Regeneration der Membran wurde durch anschließende Absättigung mit Blockierungspuffer und Detektion mit dem *StrepMAB HRP* konjugierten Antikörper überprüft. Membranen, die nach 15 min Belichtung kein Signal zeigten, wurden in TBS gewaschen, getrocknet und wieder verwendet.

### 2.3.8 Proteinbindungsanalyse aus einem Zelllysats (*pull-down-Experiment*)

Proteine die an die PDZ-Domänen von ZO-1 binden, sollten aus einem Zelllysats von Rattennierenepithelzellen (NRC) angereichert werden. Dafür wurden aufgereinigte PDZ-Domänen an Strep-Taktin Matrix immobilisiert. Zuvor wurden das Desbiothin aus dem Puffer der PDZ-Domänen durch Dialyse entfernt. Die Dialyse von 500 µl Protein erfolgte 1-2 h gegen 500 ml PBS und dann über Nacht gegen weitere 500 ml PBS. Nach einer Konzentrationsbestimmung mit BCA wurden 40 µg der PDZ-Domäne in 250 µl PBS an 50µl Strep-Taktin Sepharose für 1 h bei 8°C immobilisiert. Die Strep-Taktin Sepharose wurde in kleine Säulen gefüllt und dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Als Kontrolle wurde eine Säule mit Strep-Taktin Sepharose in 250 µl PBS inkubiert. Der Überstand wurde nach der Inkubation 1 min bei 500 xg und 4°C abzentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 1% TritonX 100 in PBS und einmal mit 0,1% TritonX 100 in PBS gewaschen.

Die NRC Zellen wurden wie unter 2.4.1 kultiviert. Zellen aus drei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen wurden auf Eis in 750 µl Lysepuffer (50 mM Tris HCl pH 7,4, 1% TritonX 100, 150 mM NaCl, Proteaseinhibitor ohne EDTA ) aufgetaut. Das Pellet wurde mit der Pipettenspitze resuspendiert und mit 30 U Mikrokokus Nuklease versetzt. Die Zellen wurden durch Scheerstress beim wiederholten Pipetieren durch eine G23 Kanüle lysiert und anschließend 1 h auf Eis inkubiert. Um Proteine die unspezifisch binden abzureichern wurde 700 µl Zelllysats 2 h bei 4 ° mit 75 µl die Strep-Taktin Matrix inkubiert. Die Matrix wurde durch Zentrifugation bei 20000xg sedimentiert. 670 µl Zelllysats wurden zurückgewonnen. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit BCA bestimmt.

Für die Anreicherung der Proteine wurden 250 µl Zelllysats 2 h bei 8°C mit <sup>13</sup>C markiertem Lysin und Arginin mit den PDZ-Domänen inkubiert. Als Kontrolle wurden 250 µl unmarkiertes Zelllysats mit der Strep-Taktin-Matrix inkubiert. Ungebundene Proteine wurden 5 min bei 500 xg 4°C entfernt. Es folgten zwei Waschschrte der Säule mit 400 µl 0,1% TritonX 100 in PBS und ein Waschschrte mit 400 µl 1% TritonX 100 in PBS. Die gebundenen Proteine wurden zweimal mit 50 µl Elutionspuffer für 10 min auf Eis inkubiert und 1 min bei 500 xg eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit 5x Proteinprobenpuffer versetzt. Gleiche Volumina der Elutionsfraktionen aus dem PDZ *pull-down-Experiment* und der Kontrolle wurden gemischt. Die Proben wurden 10 min bei 60°C erhitzt und auf einem 4-20% Polyacrylamidgel mit SDS-PAGE getrennt. Die Färbung erfolgte wie unter 2.3.9.2.

### 2.3.9 Protein-Färbung

#### 2.3.9.1 Schnelle Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blau G-250 ist ein Farbstoff, der mit Proteinen einen tiefblauen Komplex bildet. Die Nachweisgrenze für die Färbung liegt im Bereich von 1-2 µg Protein pro Bande. Für die Färbung wurde das Polyacrylamidgel in Färbelösung (6% Ethanol, 4% Perchlorsäure, 0.6 mM/L Coomassie G250) eingelegt und 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel wiederholt mit destilliertem Wasser aufgeköcht, bis der Hintergrund entfärbt war.

#### 2.3.9.2 Coomassie-Blau-Färbung für anschließende Massenspektrometrie

Die Proteine im Gel wurden in 40% Methanol (v/v) und 10% Essigsäure (v/v) 1 h fixiert. Anschließend wurde über Nacht mit Coomassie G250 Lösung (1,3 M Ammoniumsulfat, 3% (v/v) Phosphorsäure, 34% (v/v) Methanol, 1 mM Coomassie G 250) gefärbt. Das Entfärben erfolgte in 1% (v/v) Essigsäure.

### 2.3.9.3 Silberfärbung

Um Proteinmengen unter 1 µg sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Silberionen bilden mit Glu-, Asp- und Cys-Resten von Proteinen Komplexe. Durch anschließende Reduktion des Silbernitrats mit alkalischem Formaldehyd wurden die Protein-Silberkomplexe im Gel sichtbar. Für die Silberfärbung wurden die Gele 1 h in Fixierlösung (50% Ethanol, 5% Essigsäure) getaucht. Danach erfolgten Waschschriffe für 10 min in 50% Ethanol, zweimal 10 min in ddH<sub>2</sub>O, 5 min in 0,02% Natriumthiosulfat und zweimal 5 min in ddH<sub>2</sub>O. Gefärbt wurde das Gel für 30 min in 0,1%iger Silbernitrat-Lösung. Überschüssiges Silbernitrat wurde mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Zur Entwicklung wurde 0,04% Formaldehyd mit 2% Natriumcarbonat in Wasser wiederholt zum Gel gegeben, bis braune Banden deutlich zu erkennen waren. Die Reduktion wurde durch Zugabe von 5%-iger Essigsäure für 5 min gestoppt. Das Gel wurde in 1%-iger Essigsäure aufbewahrt.

### 2.3.10 Maskierung der Cysteine der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin

Die Reaktion wurde wie bei M. Ward (Walker 2008) beschrieben durchgeführt. Der Occ C wurde in Elutionspuffer mit 100 mM DTT reduziert und mit Stickstoff überschichtet. 50 µg Protein wurden 2 µl 4-Vinylpyridin zugesetzt und unter Stickstoffatmosphäre 30 min bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung der Edukte erfolgte über eine *HiPrep 26/10 Desalting* mit der Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) Anlage mit TBS Puffer.

### 2.3.11 *In vitro* Phosphorylierung

25-40 µg der PDZ-Domänen 1 und 2 wurden mit 100 ng Enzym aus dem Proteinkinase C Isozym Sampler Set versetzt. Die Proteinkinasen C (PKC) *iota* und *zeta* fehlten im Set. PKC *iota* wurde durch PKC *iota* GST ersetzt. Als Puffer für klassische und neue PKC wurde 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µM Diacylglycerol (DAG), 1 mM Phosphatidylserin (PS), 50 µM ATP verwendet. Die atypische PKC *iota* wurde in einem Puffer aus 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA und 50 µM ATP inkubiert. Für die radioaktive Markierung wurde dem Puffer 5 µCi <sup>32</sup>P-markiertes ATP zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2% SDS Puffer beendet. Die Proben wurden bei 95°C erhitzt und auf 15% PAA-Gelen getrennt. Die Detektion erfolgte mit einem *Phospho-image screen* im Storm Phosphoimager. Bei weiteren Ansätzen ohne radioaktivmarkiertes ATP wurden 10 µg PDZ mit 2,5 µl PKC α His 2h bei 30°C umgesetzt. Dem Ansatz wurde PhosStop Phosphataseinhibitor zugesetzt. Die Ansätze wurden elektrophoretisch auf einem 4-20% SDS Gradientengel getrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Gele wurden für die Analyse mit Massenspektrometrie, wie unter 2.3.17.2 beschrieben, vorbereitet.

### 2.3.12 Größenausschlusschromatografie (SEC)

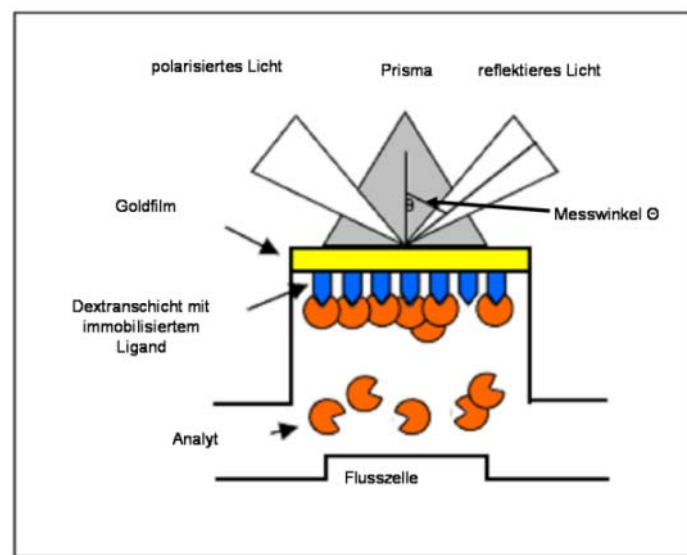
Bei der Größenausschlusschromatografie wird ein Proteingemisch in einer flüssigen Phase durch eine Säule mit einer stationären Phase gepumpt. Die stationäre Phase besteht aus einem organischen Polymer mit unterschiedlich großen Poren. Moleküle mit einem hydrodynamischen Radius kleiner als die Porengröße werden auf der Säule durch Diffusion in die Poren zurückgehalten und so von Molekülen mit größerem hydrodynamischen Radius getrennt. Moleküle die größer als die Poren der stationären Phase sind, eluieren im Ausschlussvolumen. Jedem Molekül kann so seinem hydrodynamischen Radius nach eine Elutionszeit zugeordnet werden. Eine Eichung der Säule wurde



mit globulären Proteinen bekannter Molekülmasse und Blue Dextran 2000, einem Polymer, welches das Ausschlussvolumen der Säule kennzeichnet, durchgeführt. Für die Eichung wurde Blue Dextran 2000, 2000 kDa; Rinderserumalbumin, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Chymotrypsinogen A, 25 kDa und Ribonuclease A, 13,7 kDa (*Low molecular weight Gel Filtration Calibration Kit*) verwendet. Mit der kleinsten Aminosäure Glycin, 75 Da, erfolgt eine Bestimmung der maximalen Elutionszeit. Als Säule wurde die *Superdex 75 10/300 GL* verwendet. Betrieben wurde die Säule durch eine HPLC Anlage mit zwei Pumpen *Liquid chromatograph LC-10AS*, einem Entgaser *DGU-14 A*, einem Fraktionssammler *FRC-10A* und dem UV VIS Detektor *SPD-10A*. Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm *Class LC*. Als Flüssigphase wurde filtrierter TBS oder PBS Puffer verwendet mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Für die Occludinversuche unter reduzierenden Bedingungen wurde TBS Puffer mit 20 mM DTT als Flüssigphase verwendet. Vor der Injektion der Proteine auf die Säule wurden alle Proben 10 min bei 20000 xg und 4°C zentrifugiert. 100 µl der Probe wurden appliziert. Die Lagerung der Säule erfolgte in 20% Ethanol im Kühlschrank.

### 2.3.13 Oberflächenplasmonresonanz- (SPR) Spektroskopie

Die SPR-Spektroskopie wurde zur Messung der Interaktion von Proteinen und Peptiden in Echtzeit eingesetzt. Dabei wurde ein Bindungspartner als Ligand an eine Dextranschicht immobilisiert und der andere als Analyt in einer flüssigen Phase über den Liganden geleitet. Detektiert wurde der Massenzuwachs an der Chipoberfläche, der eine Veränderung des Messwinkels  $\Theta$  zur Folge hat. Die Änderung des Messsignals setzt sich additiv aus zwei Effekten zusammen: der Veränderung der flüssigen Phase durch den Analyten (Puffersprung) sowie der Assoziation des Analyten an die Dextranoberfläche. Das Messsignal wird in Resonanzeinheiten (RU) angegeben.



**Abb. 7: Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie**

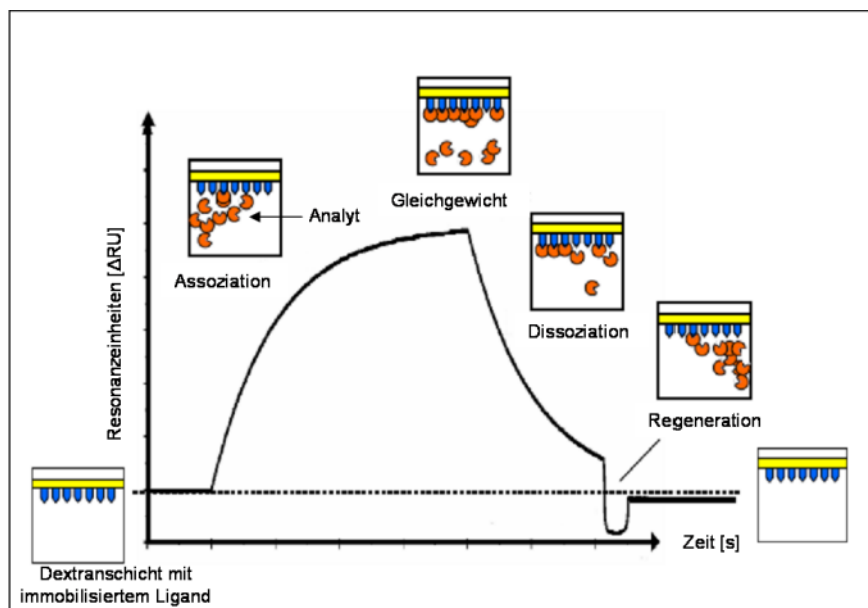
Der Analyt (orange) interagiert mit dem an der Sensorchipoberfläche immobilisierten Liganden (blau) und verursacht dadurch eine Veränderung der Resonanzbedingungen. Diese Veränderung wird als eine Verschiebung des Ausfallswinkels  $\Theta$  gemessen.

Im Experiment wird eine Kontrollzelle und eine ligandenbeschichtete Flußzelle mit dem Analyten superfundiert. Der Puffersprung wird korrigiert, indem die Resonanzeinheiten auf einer Kontrollzelle von der ligandenbeschichteten Flußzelle abgezogen werden. Das Messprinzip wird in Abb. 7

schematisch gezeigt und ausführlich bei Nagata und Handa (Nagata K. und Handa H (Eds) 2000) beschrieben. Die Messwerte wurden als Änderung der Resonanzeinheiten (RU) mit der Zeit in einem Sensorgramm erfasst. Das Ergebnis wurde als Differenzsensorgramm der Messwerte der ligandenbeschichteten Flusszelle und einer Kontrolle dargestellt. Ein Beispiel findet sich in Abb. 8.

Für die Messungen wurde ein BIAcore 2000 Gerät verwendet. Die Immobilisierung erfolgte auf CM4 oder CM5 Chips, die sich durch die Anzahl der Carboxylgruppen unterscheiden. Der Chip wurde vor der Immobilisierung mindestens 2 h mit Elutionspuffer gespült. Die Detektion der RU erfolgte mit 1 Hertz.

Vor der Beschichtung und nach dem Einlegen eines beschichteten Chips wurde das Signal mit 40% Glycerin (BIAcore) normalisiert. Vor dem Immobilisierungsschritt wurden die in TBS-Elutionspuffer vorliegenden Proteine in einen Acetatpuffer umgepuffert. Dieser Schritt entfernte den Tris-Puffer, der selbst über freie Aminogruppen verfügt und sonst anstelle der Proteine am Chip immobilisiert werden könnte. Des Weiteren wurde der pH-Wert der Lösung unter dem isoelektrischen Punkt der zu immobilisierenden Proteine eingestellt, damit die Proteine eine positive Nettoladung aufweisen. Der Pufferwechsel erfolgte in 30 kDa Filtereinheiten. Ein Milliliter der Proteinlösung mit einer Absorption bei 280 nm von ca. 0,5 wurde in 500 µl Schritten auf den Filter geladen. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C mit 14000 xg. Die Proteinlösung wurde auf 50 µl konzentriert. Dann wurde das Protein dreimal mit 500 µl Acetatpuffer gewaschen und in 400 µl Acetatpuffer aufgenommen.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Analyt und Ligand in einem Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Sensorgramm**

Während der Assoziationsphase bindet der Analyt an den Liganden an der Chipoberfläche, was in einer Zunahme der Resonanzeinheiten (RU) mit der Zeit dargestellt wird. Da der Analyt im Überschuss vorhanden ist, kommt es nach einer bestimmten Zeit zur Ausbildung eines Gleichgewichts. In der Dissoziationsphase wird kein Analyt mehr nachgeliefert und die gebundenen Analyten lösen sich von den Liganden. Da die Dissoziation häufig nicht quantitativ verläuft, wird ein Regenerationsschritt angefügt. Ziel ist es die Resonanzeinheiten, d.h. die an der Chipoberfläche gebundene Masse wieder auf den Ausgangswert zu bringen (s. gestrichelte Linie).

Um die Liganden auf dem Chip zu verankern wurde die Dextranoberfläche mit 400 nM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) als

1:1 Gemisch aktiviert. Die Aktivierung erfolgt mit 25-75 µl bei Flussraten von 5 bzw. 8 µl/min. Die Flusszellen wurden einzeln angesteuert und mit einem Liganden beschichtet. Über elektrostatische Anziehung wurden die Proteine an die Carboxylgruppen der Dextranschicht angenähert, wo die kovalente Bindung geknüpft wurde. Dazu wurde das Protein mit einer Flussrate von 5 µl/min für 5-20 min wiederholt über den Chip geleitet, bis die angestrebte Erhöhung der Resonanzeinheiten überschritten war. Übrige Carboxylgruppen wurden mit 1 M Ethanolamin (mit HCl auf pH 8.5) für 7 min mit 8µl/min abgesättigt. Um nichtgekoppelte Proteine zu entfernen, wurde der Chip mit DII Puffer, bestehend aus 1 Teil Puffer D und zwei Teilen Puffer I, 2 min mit 8 µl/min gespült. Anschließend wurde 1 min mit Puffer NS nachgespült. Die Messungen erfolgten bei unterschiedlichen Immobilisierungs-niveus (im µM Bereich) auf verschiedenen Chips. Die Analyten (Tab. 19) wurden vor der Injektion 10 min bei 20000 xg, 4°C zentrifugiert.

**Tab. 18: Eigenschaften von Occludin C Fusionsproteinen und MBP aus den Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Untersuchungen**

Protein	Molekulargewicht [Da]	Isoelektrischer Punkt	Anzahl der Aminosäuren
MBP Occ C	57051	5,08	509
GST Occ C	42848	5	365
His Occ C	17930	6,24	154
Occ C	14628	5,08	123
MBP	43102	5,03	393

Für die Messung wurden Analytkonzentrationen zwischen 0,5 µM und 20 µM für 4 min mit 8 µl/min bei 20°C eingesetzt. Die Dissoziation wurde ebenfalls für 4 min beobachtet. Danach erfolgte eine Regeneration mit Kombinationen der Puffer aus DII und NS bis das Ausgangsniveau +/- 20 RU erreicht wurde. Alle Puffer sind der Tab. 19 zu entnehmen.

Für die Auswertung wurden die Differenzresonanzeinheiten (ΔRU) nach 320 s verglichen. Dieser Wert entspricht der maximalen Assoziation des Analyten abzüglich der Resonanzeinheiten auf der Referenzzelle.

**Tab. 19: Puffer für die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie**

Name	Zusammensetzung (pro Liter Puffer)
PBS Elutionspuffer	PBS mit 5 mM Maltose
TBS Elutionspuffer	20 mM Tris HCl pH 7,8, 200 mM NaCl, 5 mM Maltose
Acetatpuffer	10 mM Natrium-Acetat pH 4
Hochsalzpuffer I	1,83 M MgCl <sub>2</sub> , 0,92 M Harnstoff, 1.83 M Guanidinhydrochlorid
Detergenspuffer D	0,3% (w/v) Chaps, 0,3% (v/v) Tween 20, 0,3% (v/v) Triton X 100
Niedrigsalzpuffer NS	10 mM NaOH, 200 mM NaCl

### 2.3.14 Circulardichroismus-(CD) Spektroskopie

Die CD Spektroskopie wird verwendet, um den Anteil der Sekundärstrukturelemente in einem Protein zu ermitteln. Dabei wird polarisiertes Licht in eine Probe eingestrahlt. Trifft das Licht auf ein Protein, werden die beiden zirkular polarisierten Komponenten durch das chirale Molekül unterschiedlich stark absorbiert. α-helikale Bereiche geben dabei im kurzwelligen UV-Bereich ein stärkeres Signal mit

einem Minimum bei einer Wellenlänge von 222 nm als  $\beta$  Faltblätter. Die Methode eignet sich auch, um Veränderungen in einer Proteinstruktur zu detektieren. Gemessen wird im UV Bereich zwischen 180 und 260 nm. Durch Chloridionen in der Lösung kann die Messung gestört und der Messbereich im kurzwelligen Bereich verkürzt werden. Deshalb wurde der Occ C aus dem TBS Puffer gegen einen Kaliumphosphatpuffer mit Fluoridionen (16 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 84 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaF, pH 7,5) über Nacht dialysiert.

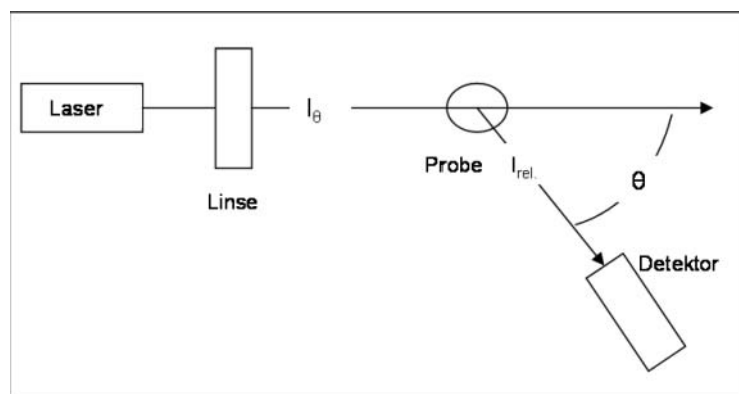
Für einen Vergleich der Sekundärstrukturanteile wurde 27,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Occ C und 29  $\mu\text{M}/\text{ml}$  blockierter Occ C eingesetzt. Beide Konzentrationen wurden aus der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Messungen wurden in 1 mm Quarzküvetten in einem J-720 Spektrometer von 205 bis 260 nm durchgeführt. Der Anteil der  $\alpha$ -Helizität wurde nach (Chen et al. 1972) berechnet.

### 2.3.15 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

In einem Mikrokalorimeter wurden 400  $\mu\text{l}$  der Peptide H2 oder cc1 als 1 mM Lösung in TBS vorgelegt. Die Kammer war auf 20°C temperiert. Alle 300 s wurde 10  $\mu\text{l}$  einer 50  $\mu\text{M}$  Occ C Lösung in TBS zugegeben. In einem zweiten Versuch wurden 20  $\mu\text{l}$  Occ C in 240 s Intervallen zugegeben. Durch rasches Mischen wurden das Protein in der Kammer verteilt. Die Enthalpieänderung wurde durch die Temperaturangleichung einer Referenzzelle ermittelt.

### 2.3.16 Lichtstreuung

Elektromagnetische Wellen, die auf ein Makromolekül treffen, werden durch dieses gestreut. Die statische Lichtstreuung ermöglicht die Messung des mittleren Molekulargewichts sowie des zweiten Virialkoeffizienten und gibt Aufschluss über die Form und Größe der Moleküle in einer Lösung. Dafür muss die Konzentration, der Brechungsindex des Puffers und das Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) bekannt sein. Das Molekulargewicht wurde durch den Vergleich der Proteinlösung mit Toluol, wie bei (Gast.K und Modler A.J. 2005) beschrieben, bestimmt. Abb. 9 enthält den schematischen Aufbau einer Lichtstreuungsmessung.



**Abb. 9: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuungsmessung**

$I_0$ = Intensität des eingestralten Lichts,  $I_{rel}$ = Intensität des abgelenkten Lichts,  $\theta$ = Detektionswinkel

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden Konzentrationsfluktuationen der Moleküle in einer Lösung gemessen und daraus der Diffusionskoeffizient bestimmt.

Je schneller die Teilchen sich bewegen, desto schneller sind die Fluktuationen der Streulichtintensität. Der Zusammenhang ist durch folgende Gleichungen gegeben:

$$D = \frac{k_B T}{f}$$

D steht für den Diffusionskoeffizienten [ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $k_B$  ist die Boltzmannkonstante [J/K], T die Temperatur [K] und f der Reibungskoeffizient. Kennt man zusätzlich die Viskosität des Lösungsmittels  $\eta$  kann man den hydrodynamischen Radius wie folgt berechnen:

$$R_s = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Die Lichtstreuungsmessungen wurden mit Dr. K. Gast an der Universität Potsdam durchgeführt. Die Occludinpräparationen wurden durch Zentrifugation 90 min bei 50000 xg und 22°C von größeren Aggregaten und Staub befreit. Die ZO-1 Proben wurden 15 min 11000 xg, 23°C sowie 60 min bei 75000 xg 20°C zentrifugiert. Der Referenzpuffer (155 mM Kalium, 100 mM Phosphat und 5 mM Maltose) wurde durch Filtration mit einem 0,1  $\mu\text{m}$  Filter gereinigt. Die Messung erfolgte bei 20°C in einem Messwinkel von 90° und einer Quarzküvette von 0,3 cm. Die Detektion erfolgte mit einem diodengepumpten kontinuierlichen Laser bei 532 nm gegen einen Toluol Standard in einer selbst gebauten Apparatur. Alle Proben wurden vor der Messung entgast. Die Konzentration der Proben wurde nach jeder Zentrifugation durch ein UV-Spektrum bestimmt. Es wurden mindestens 100 Akkumulationen gemessen. Der Diffusionskoeffizient wurde mit dem Programm CONTIN ermittelt. Als Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) für die Occludin Probe wurde 0,19 ml/g angenommen. Dieser Wert ist repräsentativ für Proteine in wässriger Lösung.

### 2.3.17 Massenspektrometrie

#### 2.3.17.1 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Messung

Die Masse von Proteinen und Peptiden wurde mit einem *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometer gemessen. Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  Proteinlösung mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 50% Acetonitril und 5 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure auf einer Probenplatte gemischt und 10 min bei Raumtemperatur auskristallisiert. Gemessen wurde im Linearmodus mit einem Massenfenster von 5-20 kDa für Proteine und für Peptide im Relektromodus mit einem Massenfenster von 700-4000 Da.

#### 2.3.17.2 Präparation der Proteine für die Massenspektrometrie

Aus den coomassiegefärbten Gelen wurden die Banden in 1 mm breite Stücke geschnitten und in 1  $\text{mm}^3$  Stücke zerkleinert. Jede Bande wurde einzeln einer Proteaseverdau unterworfen. Die Gelstücke wurden in einer Mischung aus gleichen Teilen 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril für 10 min bei 30°C gewaschen und dehydriert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 7,5, 10 min bei 30°C geschüttelt. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen. Die Gelstücke wurden anschließend in 150  $\mu\text{l}$  Acetonitril dehydriert bis sie eine weiße Farbe bekamen. Es erfolgte eine Trocknung in der Speedvac bei mittlerer Heizleistung. Der Trypsinverdau der Proteine wurde über Nacht bei 37°C und 200 rpm in einem Thermomixer

durchgeführt. Dazu wurden 1,25 µg Trypsin in 199 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 7,5 gelöst. 10 µl der Lösung wurde zu den Gelstücken gegeben. Nach dem Verdau wurden die Ansätze in einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Zum Abbruch des Verdaus wurden 10 µl 0,5% TFA in Acetonitril zu den Gelstücken gegeben und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Die Gelstücke wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Die Peptide im Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Restliche Peptide aus den Gelstücken wurden mit weiteren 20 µl Acetonitril extrahiert und der Überstand im neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Die Peptide wurden in der Speedvac getrocknet und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Für die Messung wurden die Proben in 6 µl 0,1% TFA und 5% Acetonitril in Wasser für 5 min im Ultraschallbad rehydriert. Analog wurden die PDZ-Domänen aus der *in vitro* Phosphorylierung im Gel mit den Proteinasen Chymotrypsin über Nacht bei 25°C oder mit der Protease ArgC für 3 h bei 37°C verdaut.

### 2.3.17.3 Flüssigchromatografie-Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (Nano-LC-ESI-MS/MS)

Die Proben wurden mit einem Q-TOF *Ultima quadrupole time-of-flight* Massenspektrometer, dem eine Nano-Flüssigkeitschromatografie vorgeschaltet war, vermessen. Die Ionisierung erfolgte mit einer Z-Spray Nanoelektronensprayionenquelle. Abhängig von der ursprünglichen Konzentration der Proteine im Gel, abgeschätzt anhand des coomassiegefärbten PAA-Gel, wurden zwischen 3 µl und 6 µl des Peptidgemischs eingesetzt. Die Chromatografie erfolgte bei einer Flussrate von 200 nl/min in einem Wasser-Acetonitril-Gradienten mit 0,1% Ameisensäure. Im Tandem-Massenspektrometer wurde im Positivionenmodus die Masse der einzelnen Peptide gemessen. Peptide, die mit einem Schwellenwert von mindestens 120 *Counts* detektiert wurden und mehrfachgeladen waren, wurden im MS/MS Modus weiter fragmentiert. Das Kollisionsgas war Argon mit einem Druck von  $6 \times 10^{-5}$  Millibar in der Kollisionzelle.

### 2.3.18 Identifizierung von Proteinen aus der Massenspektrometrie

Aus den im LC-ESI-MS/MS Experiment erhaltene Rohdaten wurde mit dem Programm MassLynx (Version 4.0) eine Liste der Peptidmassen erzeugt. Mit den Peptidmassen wurde mit dem Programm Mascot (Perkins et al. 1999) eine Suche nach zugehörigen Proteinen in der Swissprot Datenbank durchgeführt. Oberhalb einer Grenze (*score*) galten die Peptide als eindeutig dem jeweiligen Protein zugeordnet. Die Parameter des Programms für die Suche sind in Tab. 20 angegeben.

**Tab. 20: Parameter mit denen die Peptide im Programm MASCOT Proteinen aus der Swissprot Datenbank zugeordnet wurden.**

Parameter	Einstellung (normal)	Einstellung (SILAC-Quantifizierung)
Database	SwissProt	SwissProt
Taxonomy	All species	All species
Enzyme	Trypsin	Trypsin
Max missed cleavages	2	2
Mass tolerance precursor ions	100 ppm	100 ppm
Mass tolerance sequence ions	0,1 Da	0,1 Da
Possible modifications	Acrylamide modification of cysteine Methionine oxidation	Acrylamide modification of cysteine Methionine oxidation <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -arginine and <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -lysine
Data format	Micromass (.pkl)	Mascot generic

Aus der Anzahl der Peptide und deren *score* wurde ein Gesamt-*score* für jedes Protein angegeben. Proteine, denen mindestens 2 Peptide zugeordnet wurden, die dem Kriterium für Identität genügten, galten als identifiziert. Dabei wurden Peptide, die mehreren Proteinen zugeordnet werden konnten, immer dem Protein mit dem höchsten *score* zugerechnet.

### 2.3.19 Quantifizierung von Proteinen aus der Massenspektrometrie

Die Quantifizierung ausgewählter Peptide wird durch stabile Isotopenmarkierung der Proteine in der Zellkultur SILAC (stable-isotope labelling by amino acids in cell culture) ermöglicht (Mann 2006). Diese Methode beruht auf der Kultivierung der Zellen mit <sup>13</sup>C markierten Aminosäuren Arginin und Lysin in der Zellkultur. Im Versuch wurden die PDZ-Domänen mit Zelllysate, welches die Proteine mit schweren Aminosäuren enthielt, umgesetzt. Die Kontrollen wurden mit gleichen Mengen unmarkiertem Zelllysate umgesetzt. Durch den Verdau der Proteine mit Trypsin, welches am C-Terminus von Arginin und Lysin schneidet, wurde sichergestellt, dass in den entstehenden Peptiden jeweils eine dieser Aminosäuren vorhanden war. Durch den quantitativen Vergleich von Peptiden mit schweren und natürlichen Aminosäuren kann für ein gegebenes Peptid eine Veränderung gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Die Peptide mit den schweren Aminosäuren werden im Massenspektrum mit einer Massenverschiebung von 6 Da pro markierter Aminosäure detektiert. Das Verhältnis der Intensitäten zwischen dem Peak aus dem <sup>12</sup>C Peptid und dem <sup>13</sup>C Peptid gibt Aufschluss über das Vorkommen der Proteine in der PDZ Fraktion und der Kontrolle. Dies erfolgte mit der MSQuant-Software (<http://msquant.sourceforge.net>). Dabei galt es zu berücksichtigen, dass die Markierung der Proteine mit dem schweren Isotop nicht 100% beträgt. Der Markierungsgrad der <sup>13</sup>C haltigen Probe wurde durch den Faktor ( $V_K$ ) berücksichtigt.

$$V_K = M(V + 1) - 1$$

( $V_K$ = korrigiertes Verhältnis, M= Markierungsgrad, V= errechnetes Verhältnis in MSQuant)

### 2.3.20 Bestimmung des Markierungsgrades

Für die Quantifizierung wurden NRC Zellen mit <sup>13</sup>C markiertem Arginin und Lysin kultiviert. 1 µl des Zelllysates wurde einem Flüssigverdau mit Trypsin unterzogen. Dazu wurden 1,25 µg Trypsin in 199 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 7,5 gelöst und 6 µl zu dem Zelllysate pipettiert. Anschließend wurde die Probe mit LC-ESI-MS/MS vermessen. Eine Quantifizierung einzelner Peptide erfolgte mit dem Programm MSQuant durch Vergleich der Flächen der MS-Signale von markierten und nicht markierten Peptiden.

### 2.3.21 Bestimmung des Mischungsverhältnisses der Zelllysate

Mit diesem Versuch sollte erfasst werden, ob gleiche Mengen markiertes Zelllysate und unmarkiertes Zelllysate für das *pull-down*-Experiment eingesetzt wurden. Das <sup>13</sup>C markierte Zelllysate aus dem *pull-down*-Experiment (2.3.8) wurden im gleichen Verhältnis mit dem unmarkierten Zelllysate gemischt, in dem sie für die *pull-down*-Experimente eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Lysate mit SDS-PAGE getrennt, und zwei Banden wie unter 2.3.17.2 beschrieben mit Trypsin für die Massenspektrometrie vorbereitet. Die enthaltenen Peptide wurden wie unter 2.3.17.3 bis 2.3.19 beschrieben quantifiziert.

### 2.3.22 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen mit Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen von PKC  $\alpha$  in der Sequenz der ZO-1 PDZ-Domänen 1 und 2 wurde eine *in vitro* Phosphorylierung (s. 2.3.11) durchgeführt. Die Phosphorylierungsansätze wurden auf einem 4-20% SDS Gradientengel getrennt und wie im Kapitel 2.3.17.2 beschrieben mit Trypsin, Chymotrypsin oder ArgC verdaut. Die Analyse erfolgte mit LC-ESI-MS/MS (2.3.17.3).

### 2.4 Zellkulturtechniken

Für verschiedene Untersuchungen wurden HEK 293 und NRC Zellen kultiviert. Die Medien und Puffer sind Tab. 21 zu entnehmen.

**Tab. 21: Zellkulturbestandteile für die Kultivierung von Epithelzellen**

Lösung	Zusammensetzung	Lösungsmittel
NRC-Rattenschwanzkollagen-Lösung	10 mg/15 ml Rattenschwanzkollagen (NRC) über Nacht quellen lassen	0,2%ige sterile Essigsäure
NRC-Standardmedium	DMEM/HAEMS F12	
	5% (v/v) FCS	
	100 $\mu$ M MEM-nichtessentielle Aminosäuren	
	1% (v/v) Insulin/Transferin/Selen A	
	1% (v/v) Lipidkonzentrat (chemisch definiert)	
	1% (v/v) MEM-Vitaminlösung	
	50 $\mu$ g/ml Trypsininhibitor (Sojabohne)	PBS
	2 mM Penicilin/Streptomycin/L-Glutamin	
	20 $\mu$ g/ml Gentamicin	10 mg/ml
	30 $\mu$ g/ml Rinderhypophysenextrakt	
	393 ng/ml Dexamethason	Ethanol
	3,4 $\mu$ g/ml Liothyronin	Ethanol
25 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor	Medium/0,1%BSA	
4,1 $\mu$ g/ml Forskolin	DMSO	
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) F0415	3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> 2 g/l D-Glukose Phenolrot als pH-Indikator ohne L-Glutamin	
DMEM <sup>+</sup>	10% Fötale Kälber Serum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 5 g/ml Penicillin, 5 U/ml Streptomycin in DMEM	
DMEM <sup>FG</sup>	5% FCS, 2 mM L-Glutamin in DMEM)	
Poly-L-Lysin	20 $\mu$ g/ml	ddH <sub>2</sub> O
Phosphate Puffer (PBS)	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 6,47 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ddH <sub>2</sub> O

#### 2.4.1 Kultivierung und metabolische Markierung von Rattenepithelzellen

Für die Kultivierung von NRC Zellen wurden mit Rattenschwanzkollagen beschichtete T75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen verwendet. Für die Beschichtung wurden 40  $\mu$ l Rattenschwanzkollagen auf dem Flaschenboden verteilt und 3 h oder über Nacht getrocknet. Die Flaschen wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die NRC Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz kultiviert. Die Passage erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS und 2 min Inkubation in PBS bei 37°C auf der Wärmeplatte mit 2 ml Trypsin. Die Zellen wurden resuspendiert und in 4 ml NRC Medium aufgenommen. 2 ml der Zellen wurden in eine neue Flasche mit 8 ml Medium überführt.



#### 2.4.2 Kultivierung von humanen embryonalen Nierenepithelzellen

Die Zellen wurden in T75 Flaschen bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> 3-4 Tage zur Konfluenz kultiviert. HEK-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Flaschen gezogen. Die Beschichtung der Flaschen erfolgte für 30 min mit 25 µg/ml Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur. Für die Passage wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1-2 ml Trypsin/EDTA bei 37°C vom Boden abgelöst. Die HEK 293-Zellen wurden 1:4 (v/v) in eine neue Kulturflasche mit DMEM<sup>+</sup> überführt.

#### 2.4.3 Transiente Transfektion von humanen embryonalen Nierenepithelzellen

Deckgläschen wurden in einer 24 Well Platte verteilt und mit PBS gewaschen. Die Plättchen wurden 60 min bei 37°C mit 20 µg/ml Poly-L-Lysin beschichtet. Die HEK-Zellen wurden 1:6 in 600 µl DMEM<sup>+</sup> eingesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen waren am nächsten Morgen 70-95% konfluent. 2 h vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und es erfolgte ein Mediumwechsel gegen DMEM<sup>FG</sup>. Für die Transfektion wurden 2 µl Lipofektamin pro Deckgläschen mit 0,8 µg DNA gemischt und die Zellen nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 4-6 h wurde das Lipofektamin-DNA Gemisch gegen 800 µl DMEM<sup>FG</sup> getauscht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein Wechsel gegen DMEM<sup>+</sup> Standardmedium. Die Plasmide mit PDZ 2 in pE<sup>C</sup>/<sub>γ</sub>FP, der Mutante PDZ 2 H209G 2 in pE<sup>C</sup>/<sub>γ</sub>FP und pECFP-EYFP Tandem wurden freundlicherweise von C. Gagel zur Verfügung gestellt.

#### 2.4.4 Interaktionsmessungen in lebenden Zellen

Zur Messung der Interaktion von PDZ 2 Mutanten wurden Plasmide in HEK 293-Zellen kotransfiziert und bis zu einer Konfluenz von 90-100% auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Die Deckgläschen wurden in einen Halter transferiert und mit 1 ml DMEM mit 10 mM HEPES pH 7,5 ohne Phenolrot bedeckt. Die Analyse erfolgte am LSM 510 NLO mit der Akzeptor-Bleich-Methode. Dabei wurde von einem Donor-Fluorophor (CFP) Energie auf ein Akzeptor-Fluorophor (YFP) strahlungsfrei übertragen, wenn sie sich in räumlicher Nähe befanden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Die Effizienz des Energietransfers hängt mit  $r^6$  von der Entfernung der Fluorophore ab. Für die meisten FRET-Paare liegt die maximale Entfernung in einem Bereich von 10 nm (Karpova et al. 2003).

Bei der Akzeptor-Bleich-Methode wurde der Akzeptor (YFP) durch einen Laser bei 514 nm photochemisch zerstört, sodass er keine Energie des Donors (CFP) mehr aufnehmen konnte. Nach Ausbleichen des Akzeptors stieg die Energie des Donors an, falls es im Vorfeld eine Übertragung gegeben hatte. Die Messungen wurden in drei Zyklen durchgeführt. Im ersten Zyklus wurde die Intensität des angeregten CFP detektiert. Im zweiten und dritten Zyklus wurde das YFP ausgebleicht und anschließend die Fluoreszenz des CFP detektiert. Der Bereich der Zelle in dem die Messung stattfand bezeichnet man als Region des Interesses (ROI). Die CFP Fluoreszenz nach dem zweiten Bleichen von YFP wurden mit der ursprünglichen CFP Fluoreszenz verglichen. Die FRET Effizienz ( $F_E$ ) wurde berechnet nach:

$$F_E = \frac{((I_{D,n} - I_{D,v}) \cdot 100)}{I_{D,n}}$$

$I_{D,n}$  Intensität des Donors nach dem Ausbleichen,  $I_{D,v}$  Intensität des Donors vor dem Ausbleichen.

Als Negativkontrolle wurden die Plasmide pECFP-<sub>N/C</sub>1 und pEYFP-<sub>N/C</sub>1 kotransfiziert (s. 2.4.3). Die Positivkontrolle bestand aus einem Plasmid, welches C-terminal CFP und N-terminal YFP in einer Polypeptidkette enthielt. Die PDZ Plasmide kodierten die PDZ 2-Domänen mit YFP oder CFP Fusionsprotein. Bei den Mutanten wurde Histidin in Position 209 durch Glycin ersetzt.

### 2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung der FRET Daten wurde zuerst ein Test auf Normalverteilung der Messwerte mit dem Schnelltest nach David (<http://www.mathematik.uni-marburg.de/~lohoefer/phaufgaben/Typisierung%20von%20Verteilungen.pdf>) durchgeführt.

Messpunkte, die eine starke Abweichung vom Mittelwert zeigten, wurden ausgeschlossen, falls sie den Kriterien des Ausreißertests nach Pearson und Hartley ([http://www.statistics4u.info/fundstat\\_germ/ee\\_pearson\\_outliertest.html](http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/ee_pearson_outliertest.html)) entsprachen.

Die Varianzanalyse erfolgte mit dem ANOVA Test als unabhängige Stichprobenanalyse (<http://faculty.vassar.edu/lowry/aova1u.html>). Die Signifikanz wurde mit dem Tukey HSD Test angegeben.

### 2.6 Programme

Die Vergleiche der Proteine aus den Peptidbibliotheken und den massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mit *Scaffold* (Proteome Software Inc. Portland, USA) durchgeführt. *Cartoon*-Darstellungen von Proteinen wurden mit *Jmol* (Ver.1.02) (<http://molvis.sdsc.edu/fgij/fg.htm?mol=1wpa>) oder *pymol 1.1* (Delano scientific LLC) erzeugt. Die Phosphorylierungstellen in den PDZ-Domänen wurden mit NetPhos und NetphosK gesucht (Blom et al. 1999; Blom et al. 2004).

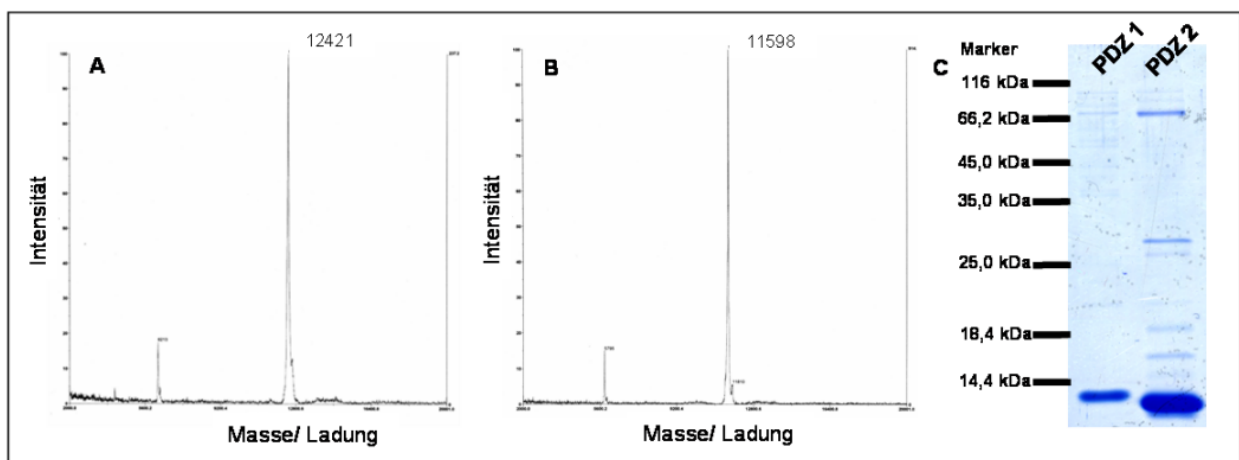
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die PDZ-Domänen von Zonula Occludens 1

Die PDZ-Domänen von Zonula Occludens-1 (ZO-1) konnten in ihrer Funktion und Interaktion charakterisiert werden. Neue Bindungspartner wurden aus Peptidbibliotheken und Proteomuntersuchungen an Rattenepithelzellen gefunden. Die Funktion der PDZ-Domänen und die Regulation der Bindung an ihre Interaktionspartner wurden auf molekularer Ebene durch den Austausch einzelner Aminosäuren untersucht.

##### 3.1.1 Die PDZ-Domänen 1 und 2 wurden rekombinant aus *Escherichia coli* gereinigt

Die Identität der Proteine und Reinheit wurde durch SDS-Gelelektrophorese (Abb. 10 C) und massenspektrometrische Analyse sichergestellt (Abb. 10 A+B).



**Abb. 10: Massenspektren und Polyacrylamidgelle von ZO-1 PDZ 1 und 2-Domäne**

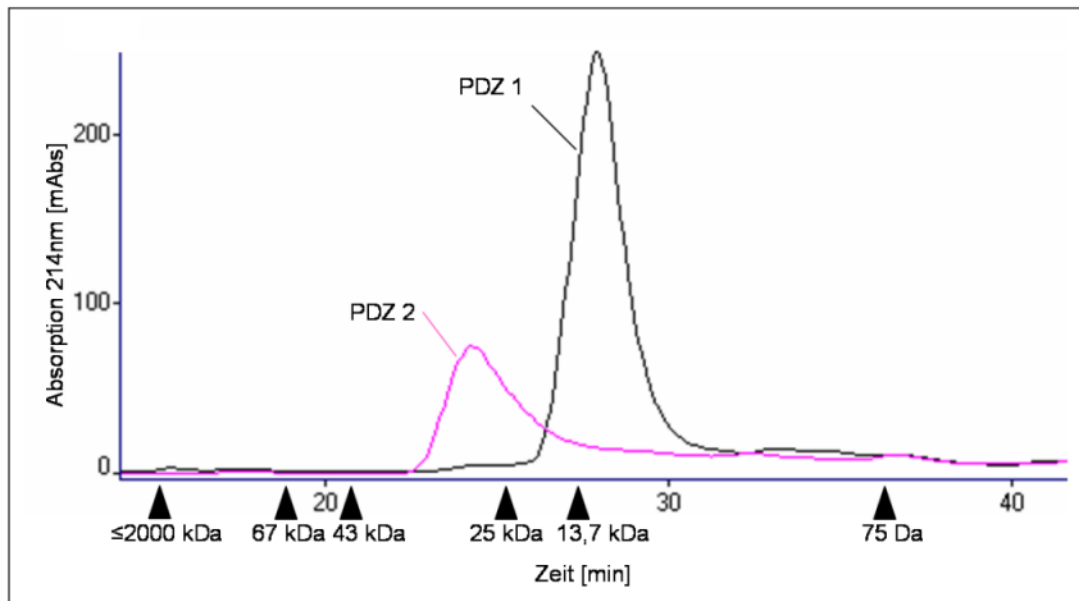
**A** Massenspektrum der PDZ 1-Domäne **B** Massenspektrum der PDZ 2-Domäne Das erste Signal entspricht dem zweifach geladenen Ion der PDZ-Domäne, das zweite entspricht der einfach geladenen PDZ-Domäne. **C** PDZ 1 und PDZ 2-Domäne unter reduzierenden Bedingungen auf einem 15% Polyacrylamidgel getrennt. Links wurde zum Vergleich der Molekulargewichts-Marker eingezeichnet.

Die PDZ 1-Domäne zeigte im Massenspektrum eine Größe von  $12421 \pm 20$  Da. Das errechnete Molekulargewicht entspricht  $12403$  Da. Die PDZ 2-Domäne hatte im Massenspektrum eine Größe von  $11598 \pm 20$  Da. Die berechnete Masse beträgt  $11606$  Da. Damit entsprechen die gemessenen Massen den berechneten Massen im Rahmen der Messgenauigkeit.

##### 3.1.2 Die PDZ 2-Domäne liegt *in vitro* als Dimer vor – die PDZ 1-Domäne hingegen als Monomer

Die gereinigten PDZ-Domänen wurden mit Größenausschlusschromatografie (Abb. 11) und Lichtstreuung (Tab. 22) auf ihren Oligomerisierungsgrad untersucht.

## Ergebnisse



**Abb. 11: Größenausschlusschromatografie der PDZ-Domänen von ZO-1**

Mit SEC erfolgte die Abschätzung der Reinheit und Größe der PDZ-Domänen. Als schwarze Pfeile wurden die Elutionszeiten von globulären Markerproteinen aus dem LMW Kit von Amersham angegeben.

Die PDZ 1-Domäne eluierte nach 27,8 Minuten (min). Verglichen mit dem globulären monomeren Protein Ribonuklease A (Molekulargewicht 13,7 kDa), welches eine Elutionszeit von 27,4 min aufweist, kann auf ein Monomer geschlossen werden. Die PDZ 2-Domäne ist in der Masse mit der PDZ 1-Domäne vergleichbar, zeigte aber eine kürzere Elutionszeit nach 23,7 min (s. Abb. 11). Dies spricht für einen größeren hydrodynamischen Radius, der durch Lichtstreuung (Tab. 22) bestätigt wurde. Der größere hydrodynamische Radius deutet auf eine Dimerisierung der PDZ 2-Domäne hin.

**Tab. 22: Lichtstreuungsuntersuchungen der PDZ-Domänen**

Die Spalte zwei enthält die errechneten Molekulargewichte der PDZ-Domänen. In Spalte drei ist der gemessene hydrodynamische Radius eingetragen.

	M (g/mol)	Hydrodynamischer Radius (nm)
PDZ 1	Monomer: 12403	2,0
PDZ 2	Monomer: 11606 Dimer: 23212	2,8

Eine Bestimmung der Molekulargewichte der PDZ-Domänen mit statischer Lichtstreuung war nicht möglich, da die Konzentration nicht exakt bestimmt werden konnte. Dies lag an einer Absorption bei 260 nm, deren Ursprung eine Verunreinigung mit Nukleinsäuren sein könnte. Ein Nukleinsäureverdau während der Reinigung der Proteine konnte die Absorption nicht verringern. Die Bestimmung der Konzentration durch Vergleich mit Albumin im BCA Test war für die Berechnung des Molekulargewichts zu ungenau.

### **3.1.3 Die Struktur der PDZ 2-Domäne**

Die PDZ 2-Domäne liegt als Dimer vor (Gagell 2008; Utepbergenov et al. 2006). Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde die Mutante PDZ 2 H209G erzeugt, bei der im  $\beta$  Strang 2 und 3 ein Histidin gegen Glycin ausgetauscht wurde. Glycin ist ein typischer Bestandteil von  $\beta$ -Kehren (Sibanda und Thornton 1985), die einen Knick zwischen dem  $\beta$ -2 und  $\beta$ -3 Strang einführen könnte. Dieser Knick könnte die Dimerisierung unterbinden. Die Glycinvariante tritt in PDZ-Domänen auf, die über eine kurze Verbindung zwischen dem  $\beta$ -2 und  $\beta$ -3 Strang verfügen und nicht dimerisieren (Fanning et al. 2007b). Mithilfe der PDZ-Mutante sollte geklärt werden, ob das Histidin wesentlich für die Struktur des PDZ 2 Dimers ist. Die Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

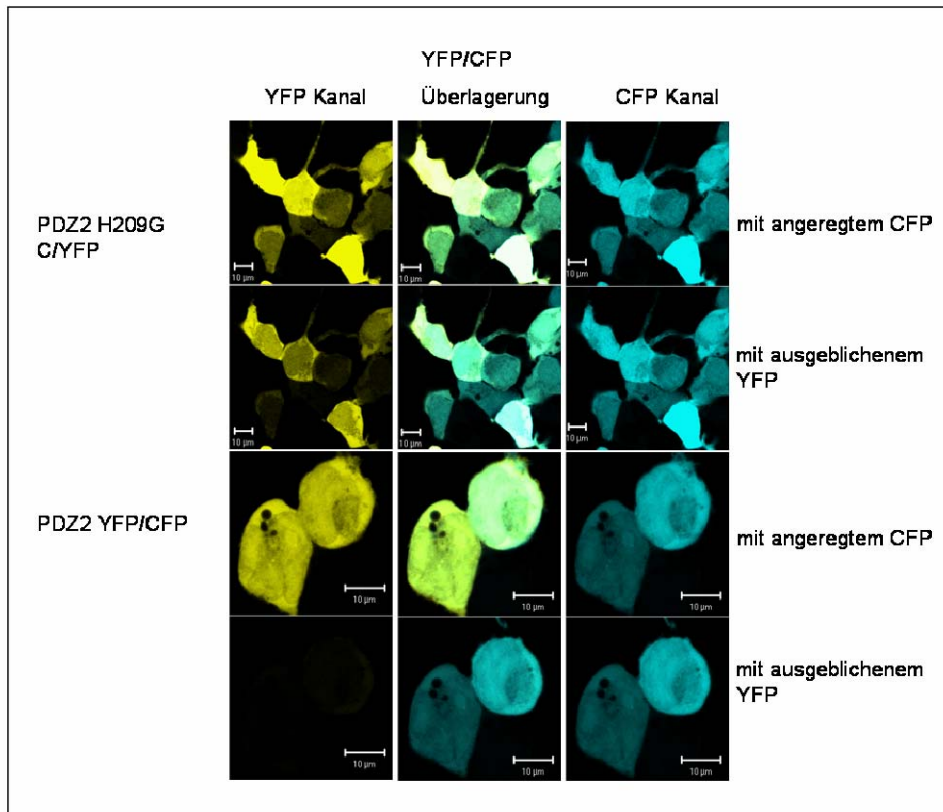
#### **3.1.3.1 Untersuchung der Dimerisierung der PDZ 2 H209G Mutante mittels Größenausschlusschromatografie**

Die Mutante PDZ 2 H209G wurde im Expressionsstamm *E. coli* Origami pLacI exprimiert und mittels Affinitätschromatografie gereinigt. PDZ 2 H209G eluierte nach 23,6 Minuten (Anhang 9) wie die PDZ 2-Domäne (s. Abb. 11). Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation den hydrodynamischen Radius der Domäne nicht verändert.

#### **3.1.3.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zeigt: die PDZ 2 H209G Mutante bildet Dimere in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293-Zellen)**

Die Dimerisierung der PDZ 2 H209G mit sich selbst und der PDZ 2-Domäne wurde im FRET-Experiment mit der Akzeptor-Bleich-Methode nachgewiesen. Die PDZ 2-Domänen, die Mutante PDZ 2 H209G und ein Mix aus PDZ 2 und PDZ 2 H209G als CFP und YFP Fusionsprotein wurden in HEK 293-Zellen ko-exprimiert. Als Positivkontrolle wurde ein Protein mit CFP und YFP in einer Polypeptidkette exprimiert. Für die Negativkontrolle wurden CFP und YFP einzeln transfiziert. Die Positivkontrolle zeigte die höchste FRET-Effizienz. Die Messwerte der Negativkontrolle und die PDZ-Proben entsprachen nach dem David Schnelltest der Normalverteilung und wurden mit dem Anova-Test statistisch ausgewertet (Tab. 23). Ausreißer wurden nach Pearson und Hartley identifiziert und entfernt. In Abb. 12 und Abb. 13 sind HEK 293-Zellen, die die FRET-Partner exprimieren vor und nach dem Bleichen dargestellt. Alle Fusionsproteine verteilen sich in der gesamten Zelle. Es ist keine Anreicherung der PDZ 2 oder PDZ 2 H209G Fusionsproteine an den Zellkontakten zu erkennen.

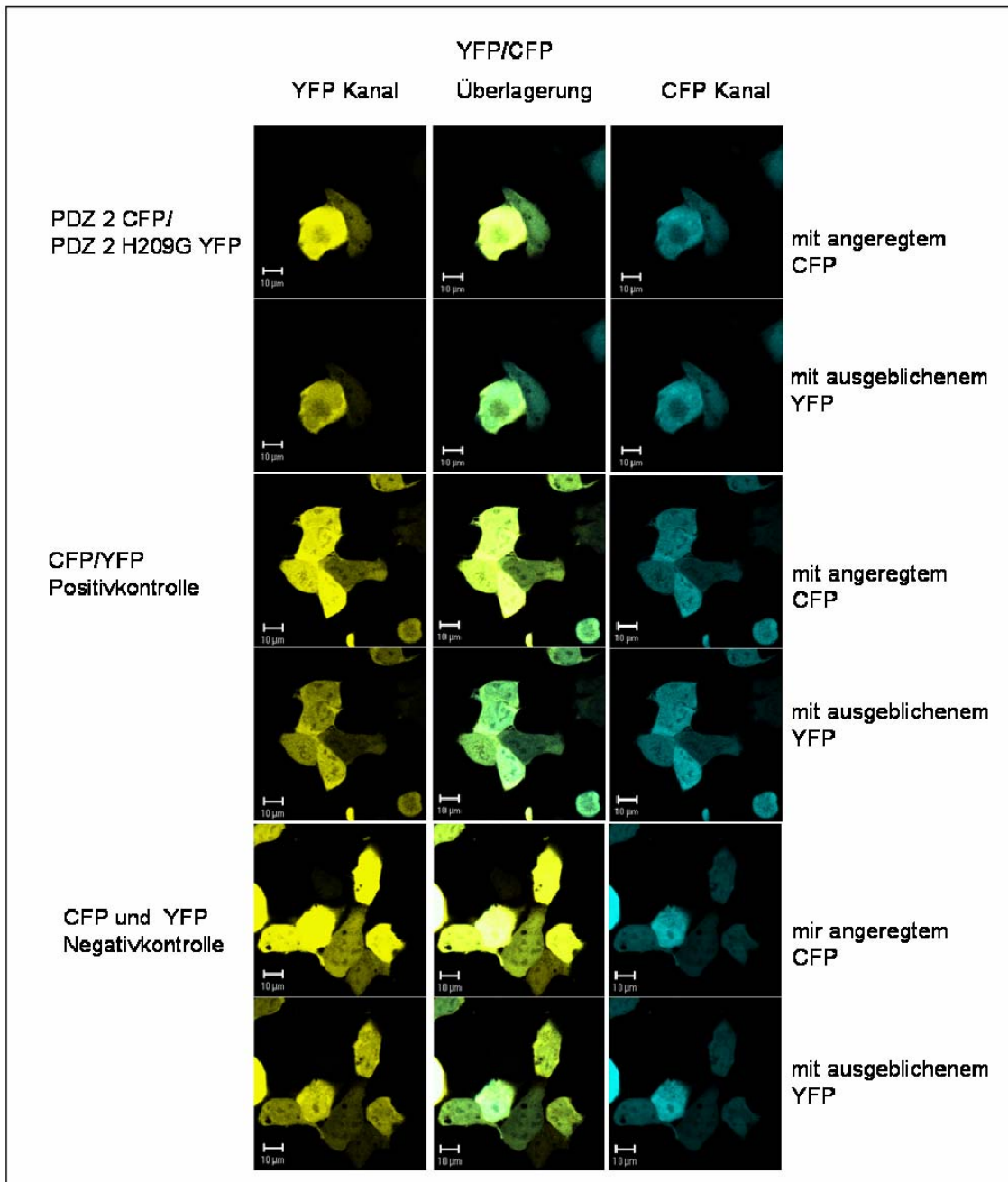
## Ergebnisse



**Abb. 12: Expression von CFP und YFP fusionierten PDZ 2-Domänen und der Mutante PDZ 2 H209G in HEK 293-Zellen**

Die Analyse erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Blende 400 µm), mit einer CFP-Anregungswellenlänge von 458 nm. Die linke Spalte zeigt die Expression des YFP-Fusionsproteins und darunter dieselben Zellen nach dem Ausbleichen bei 514 nm exemplarisch für alle Proteinkombinationen. In der Mitte ist die Überlagerung der CFP und YFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine vor und nach dem Bleichen zu sehen. Rechts ist die CFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine in denselben Zellen vor und nach dem Bleichen abgebildet. Die Fusionsproteine waren über die gesamte Zelle verteilt (siehe auch Abb. 13).

## Ergebnisse



**Abb. 13: Expression von PDZ 2 CFP und der Mutante PDZ 2 H209G YFP sowie CFP und YFP Kontrollen in HEK 293-Zellen**

Die Analyse erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Blende 400 µm), mit einer CFP-Anregungswellenlänge von 458 nm. Die linke Spalte zeigt die Expression des YFP-Fusionsproteins und darunter dieselben Zellen nach dem Ausbleichen bei 514 nm exemplarisch für alle Proteinkombinationen. In der Mitte ist die Überlagerung der CFP und YFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine vor und nach dem Bleichen zu sehen. Rechts ist die CFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine in denselben Zellen vor und nach dem Bleichen abgebildet. Die Fusionsproteine waren über die gesamte Zelle verteilt (siehe auch Abb. 12).

**Tab. 23: Selbstinteraktion der PDZ 2-Domäne und der Mutante PDZ 2 H209G in humanen embryonalen Nierenzellen**

In HEK-Zellen wurden YFP und CFP fusionierte FRET-Paare der PDZ 2-Domäne oder der Mutante PDZ 2 H209G exprimiert. Als Positivkontrolle wurde ein Fusionsprotein aus YFP-CFP vermessen. Die Negativkontrolle stellten ko-transfiziertes YFP und CFP dar. Die lebenden Zellen wurden unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit der Akzeptor-Bleich-Methode untersucht. Die statistische Absicherung der Unterschiede erfolgte mit dem ANOVA-Test.

FRET-Paar	Mittelwert der FRET-Effizienz	Standardfehler vom Mittelwert	Anzahl der Messungen
CFP/YFP Positivkontrolle	17,6	0,93	118
CFP und YFP Negativkontrolle	-0,9	0,18	112
PDZ 2-CFP / PDZ 2-YFP	1,6	0,31	172
PDZ 2 H209G-CFP / PDZ 2 H209G- YFP	4,2	0,39	140
PDZ 2-CFP / PDZ 2 H209G-YFP	2,6	0,89	57

Die Werte waren bei einem Kriterium von  $P < 0,01$  für alle PDZ-Domänen gegenüber der Positivkontrolle und Negativkontrolle signifikant. Eine Ausnahme bildet die Negativkontrolle gegenüber der PDZ 2-Domäne. Hier lag die Signifikanz bei  $P < 0,05$ . Der Austausch von Histidin gegen Glycin im  $\beta$ -Strang 2-3 der PDZ 2-Domäne führte zu keiner Beeinträchtigung der Selbstinteraktion.

### 3.1.4 In Peptidbibliotheken wurden neue Bindungspartner der ZO-1 PDZ-Domänen identifiziert

Zellkontakte sind dynamische Strukturen, an deren Aufbau und Funktion verschiedene Proteine beteiligt sind. In Peptidbibliotheken und Epithelzelllysaten wurde mit den PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 nach unbekanntem Bindungspartnern gesucht. Die Peptidbibliotheken bestanden aus Peptiden mit einer Länge von 11 Aminosäuren, die mit dem N-Terminus an einer Cellulosemembran verankert waren. Die erste Peptidbibliothek enthielt eine Auswahl von 50 Membranproteinen und  $\alpha$ -Catenin. Als Positivkontrollen für die PDZ 1-Domäne waren C-Termini von Claudinen (Cld) enthalten. Bei der PDZ 2-Domäne ist eine Bindung an die C-Termini der Connexine 43 und 45 bekannt. Die C-Termini von Occludin und  $\alpha$ -Catenin dienen als Negativkontrolle. Beide Proteine sind Bindungspartner von ZO-1. Ihre Interaktion mit ZO-1 erfolgt aber über die SH3-*hinge*-GuK-Einheit und nicht über die PDZ-Domäne (Muller et al. 2005; Schmidt et al. 2004). Die Peptidbibliothek sollte als Test für die Erkennung der Peptide durch die PDZ-Domänen dienen. Eine Liste der Peptidsequenzen mit dem zugehörigen Proteinnamen enthält Tab. 24. Bei Unterschieden in den letzten 11 Aminosäuren der Proteine wurden alle Isoformen, die in der Swiss-Prot Datenbank enthalten waren, berücksichtigt.



## Ergebnisse

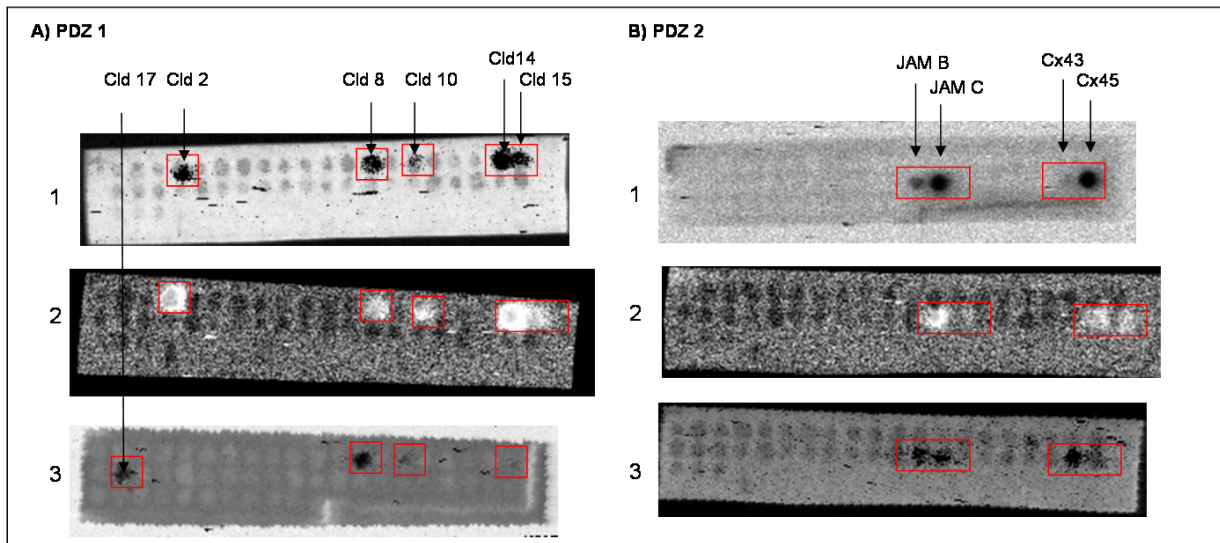
**Tab. 24: Bindungspartner der PDZ-Domänen 1 und 2 in einer 51 Peptide umfassenden Peptidbibliothek aus Zellkontaktproteinen und *multidrug resistance* Proteinen.**

Die Tabelle enthält die Sequenz der 11 Aminosäuren langen C-terminalen Peptide, deren Bindung an die PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 getestet wurde. In den letzten beiden Spalten wurde die Häufigkeit (n) der Interaktionen in 3 verschiedenen Experimenten dargestellt.

Position	Sequenz	Swiss-prot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Bindung an PDZ 1 in n Experimenten	Bindung an PDZ 2 in n Experimenten
1	KMVG DYDRQKT	Q16625	OCLN	Occludin	0	0
2	ALSEFKAMDSI	P35221	CTNA1	Catenin alpha 1	0	0
3	KPAPSSGKD YV	O95832	CLD1	Claudin 1	0	0
4	EFNSYSLTGYV	P57739	CLD2	<b>Claudin 2</b>	<b>2</b>	0
5	LGTGYDRKDYV	O15551	CLD3	Claudin 3	0	0
6	AARSAASNYV	O14493	CLD4	Claudin 4	0	0
7	ATGDYDKKNYV	O00501	CLD5	Claudin 5 Isoform 1	0	0
8	DYDKKNYVDYK	O00501	CLD5	Claudin 5 mit Flag-tag	0	0
9	DYDKKNYVAAA	O00501	CLD5	Claudin 5 Kontrolle	0	0
10	ATGDYDKKNYV	O00501	CLD5	Claudin 5 Isoform 2	0	0
11	GPSEYPTKNYV	P56747	CLD6	Claudin 6	0	0
12	YPKSNSKEYV	O95471	CLD7	Claudin 7	0	0
13	SPSVYRSQYV	P56748	CLD8	<b>Claudin 8</b>	<b>3</b>	0
14	GASGLDKRDYV	O95484	CLD9	Claudin 9	0	0
15	PSKQFDKNAYV	P78369	CLD10	<b>Claudin 10</b>	<b>3</b>	0
16	SSPTHAKSAHV	O75508	CLD11	Claudin 11 Isoform 1	0	0
17	KRAARLPTEVL	O75508	CLD11	Claudin 11 Isoform 2	0	0
18	EIDIPVVSHTT	P56749	CLD12	Claudin 12	0	0
19	THSGYRLNDYV	O95500	CLD14	<b>Claudin 14</b>	<b>2</b>	0
20	SFGKYGRNAYV	P56746	CLD15	<b>Claudin 15</b>	<b>3</b>	0
21	TAKMYAVDTRV	Q9Y517	CLD16	Claudin 16	0	0
22	TMLSKTSTSYV	P56750	CLD17	<b>Claudin 17</b>	<b>1</b>	0
23	VQSYPKHDYV	P56856	CLD18	Claudin 18	0	0
24	LPASAKGPLGV	Q8N6F1	CLD19	Claudin 19	0	0
25	NNSTHNLKDYV	P56880	CLD20	Claudin 20	0	0
26	ELETRNTNLKH	Q8N7P3	CLD22	Claudin 22	0	0
27	CDSSLPCDSDL	Q96B33	CLD23	Claudin 23	0	0
28	EYTLMKAYRVA	Q9NY35	CLDN1	Claudindomänen beinhaltendes Protein 1	0	0
29	GLDNDYVESPC	Q9BSN7	TM204	Claudin-ähnliches Protein 24	0	0
30	KVQTRHVTWAL	Q01453	PMP22	Peripheres-Myelinprotein 22	0	0
31	GEFKQTSSFLV	Q9Y624	JAM A	<i>Junctional adesion molecule A</i>	0	0
32	NDFKHTKSFII	P57087	JAM B	<b><i>Junctional adesion molecule B</i></b>	0	<b>3</b>
33	GDFRHKSSFVI	Q9BX67	JAM C	<b><i>Junctional adesion molecule C</i></b>	0	<b>3</b>
34	KVMNWD TQGYV	A1BQX3	A1BQX3	Tricellulin Isoform A (Maus)	0	0
35	SPNTLVKHQLP	Q8NE79	POPD1	<i>Blood vessel epicardial substance</i>	0	0
36	IPAQSKDGTVV			Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor (CAR) (Maus)	0	0
37	IPAQSKDGSIV	P78310-1	CXAR	CAR	0	0
38	YPYKTDGITVV	P78310-2	CXAR	CAR Isoform 2	0	0
39	SSRPRDDLEI	P17302	CXA1	<b>Connexin 43</b>	0	<b>3</b>
40	KSGDGNVSWVI	P36383	CXG1	<b>Connexin 45</b>	0	<b>3</b>
41	IMSSGNVNSSS	P21553	EDG1	Sphingosin 1-Phosphate Rezeptor Edg-1	0	0
42	NAALQNGIFCN	Q99500	EDG3	Sphingosin 1-Phosphate Rezeptor Edg-3	0	0
43	YELLITGGTYA	O60637	TSN3	Tetraspanin 3	0	0
44	MVSVQAGTKRQ	P08183	MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>	0	0
45	AQLSFNTD TLC	Q9BZC7	abca2	ATP-Bindungskassette Unterfamilie A Mitglied 2	0	0
46	FYSMAKDAGLV	P33527	MRP1	<i>Multidrug resistance associated protein 1</i>	0	0
47	AGIENVNSTKF	Q92887	MRP2	<i>Canalicular multispecific organic anion transporter 1</i>	0	0
48	FYGMARDAGLA	O15438	MRP3	<i>Canalicular multispecific organic anion transporter 2</i>	0	0
49	PSTLTIFETAL	Q9BX28		Wurde aus swiss-prot gelöscht.	0	0
50	AAAENKVAVKVG	O15440	MRP5	Multidrug resistance associated protein 5	0	0
51	YLKLLFLKKYS	Q9UNQ0	abcg2	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie G, Mitglied 2	0	0

## Ergebnisse

Die PDZ 1-Domäne von ZO-1 hat in drei Versuchen an die C-terminalen 11 Aminosäuren langen Peptide von Cld 8,10,15, in zwei Fällen an Cld 2 und 14 und in einem Fall Cld 17 gebunden (Abb. 14 A). Der C-Terminus von Cld 15 wurde auf diese Weise zum ersten Mal *in vitro* als Bindungspartner der ZO-1 PDZ 1-Domäne beschrieben. Die C-Termini der Cld 3, 5 und 12, die in Epithelzellen am Verschluss des parazellulären Spaltes beteiligt sind, konnten in diesen Experimenten nicht als Bindungspartner identifiziert werden. Eine Interaktion mit den C-terminalen Peptiden von ausgewählten *multidrug resistance* Proteinen konnte nicht detektiert werden. Die Negativkontrollen  $\alpha$ -Catenin und Occludin wurden nie erkannt.



**Abb. 14: Bindungspartner der PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 identifiziert in einer Peptidbibliothek aus 51 Peptiden**

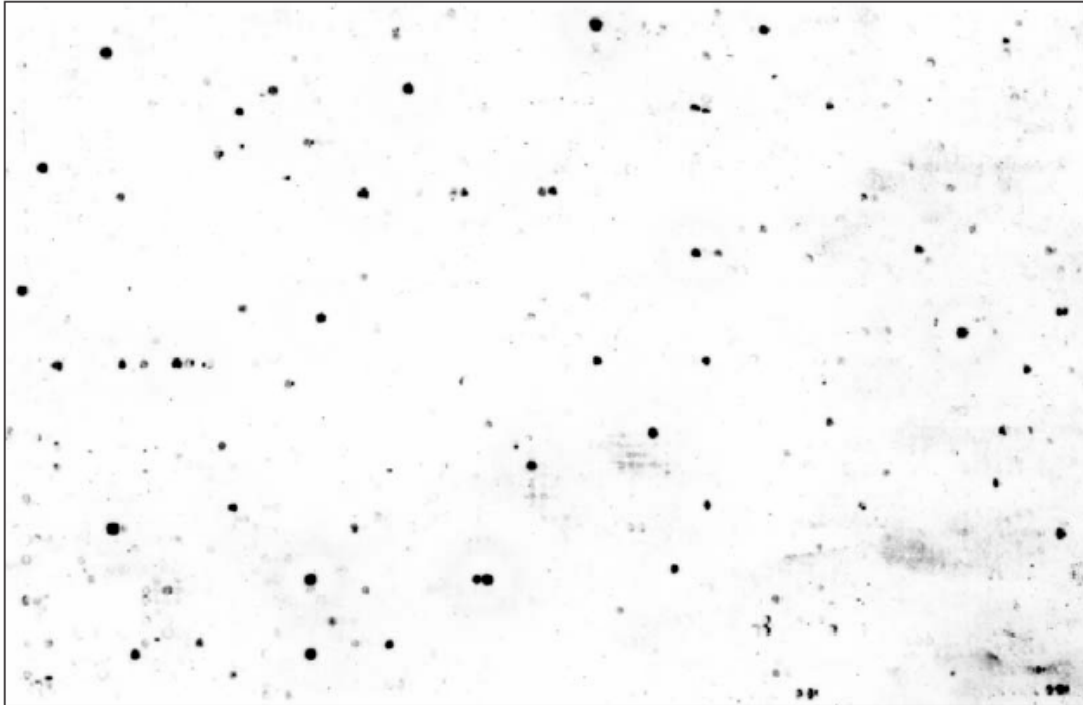
Peptidmembranen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit den PDZ-Domänen 1 und 2 inkubiert. Die grauen Punkte im Hintergrund der Membranen zeigen die Stellen an, wo sich die synthetisierten Peptide befinden. Die rot umrandeten Punkte repräsentieren Peptide, an die die PDZ-Domänen gebunden haben. Die PDZ-Domäne wurde durch einen Antikörper detektiert. Zusätzlich kennzeichnen die schwarzen Pfeile die Proteine, an deren C-Terminus die PDZ-Domäne gebunden hat.

Die PDZ 2-Domäne wurde ebenfalls auf der 51 Peptide umfassenden kleinen Bibliothek getestet und zeigte in drei unabhängigen Versuchen eine Bindung an Connexin 43 und 45 sowie JAM B und C (Abb. 14 B). Damit konnte zum ersten Mal eine Zuordnung der Proteine JAM B und C als Bindungspartner der PDZ 2-Domäne von ZO-1 getroffen werden. Die Negativkontrollen Occludin und  $\alpha$ -Catenin wurden von der PDZ 2-Domäne nicht erkannt. Eine Bindung von CAR an ZO-1 wird diskutiert, da das Protein in Epithelzellen mit ZO-1 ko-lokalisiert, ein PDZ-Bindungsmotiv besitzt und im *pull-down*-Experiment mit ZO-1 präzipitiert (Cohen et al. 2001). Deshalb wurde die Interaktion zwischen ZO-1 und verschiedenen Isoformen der C-terminalen 11 Aminosäuren von CAR untersucht. Es konnte weder für die PDZ 1 noch die PDZ 2-Domäne eine direkte Interaktion gezeigt werden. Es bleibt die Möglichkeit einer direkten Interaktion von CAR mit der PDZ 3-Domäne von ZO-1 oder eine Kopräzipitation des Proteins im *pull-down*-Experiment vermittelt durch ein weiteres TJ-Protein. Untersuchungen von Ebnet et al. (2003) zeigen, dass CAR *in vitro* an ein längeres Fragment von ZO-1, welches die AS 6-1256 enthält, bindet. Dies eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, dass die Interaktion

## Ergebnisse

mit ZO-1 unabhängig von den PDZ-Domänen erfolgt.

Die reproduzierbare Bindung an die Peptide auf der kleinen Membran zeigte, dass sich das System eignet, um nach unbekanntem Bindungspartnern in einer 6223 Peptide umfassenden Bibliothek zu suchen. Das Ergebnis für PDZ 1 ist in Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 15: Bindungspartner von ZO-1 PDZ 1 in einer Peptidbibliothek mit 6322 C-terminalen Peptiden von humanen Proteinen**

In schwarz sind die Peptidpunkte zu sehen, auf denen der Antikörper an die PDZ 1-Domäne gebunden hat. Es wurden 86 Peptide als Bindungspartner identifiziert. Die Detektion erfolgte im Lumi-Imager für eine Minute mit Luminol (Pierce).

Die detektierten Peptide mit den Intensitäten gemessen in Böhlinger Light Units (BLU) sind in Tab. 25 dargestellt. Ein Peptid wurde als Bindungspartner gewertet, wenn die Chemilumineszenz in diesem Punkt 100000 BLU überschritt. Es wurden 86 C-Termini identifiziert, von denen sechs eventuell falsch positiv detektiert wurden (rote Schrift). Darunter befand sich auch Claudin 16. Als falsch positiv wurden Punkte definiert, bei denen die Schwärzung der Luminolreaktion nicht vollständig einem Peptidpunkt zugeordnet wurde. In grüner Schrift sind Proteine gekennzeichnet, die mit Zellkontakten oder deren Regulation in Verbindung stehen. Die 39 kursiv gesetzten Proteine wurden als Bindungspartner von beiden PDZ-Domänen erkannt.

Ergebnisse

**Tab. 25: Zusammenstellung der 86 Bindungspartner von ZO-1 PDZ 1**

86 Bindungspartner der PDZ 1-Domäne detektiert auf einer 6223 C-Termini umfassenden humanen Bibliothek aus Peptiden mit 11 Aminosäuren immobilisiert auf einer Cellulosemembran. Die Detektion erfolgte nach Inkubation der Bibliothek mit der PDZ 1 Domäne durch Identifizierung des Strep-tags mittels eines Antikörpers. 6 rot unterlegte Peptide konnten nicht mit Sicherheit einem Punkt zugeordnet werden. Grün unterlegte Peptide stehen mit Zellkontakten oder deren Regulation in Verbindung. 39 kursiv gesetzte Proteine wurden sowohl von PDZ 1 als auch von PDZ 2 erkannt.

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
<b>Membranproteine</b>						
1072	174720	SFGKYGRNAYV	P56746	CLD15	CLAUDIN-15.	TJ-Protein, Zellzellkontakt
1071	686723	THSGYRLNDYV	O95500	CLD14	CLAUDIN-14.	TJ-Protein, Zellzellkontakt
1068	184595	PSKQFDKNAYV	P78369	CLD10	CLAUDIN-10	TJ-Protein, Zellzellkontakt
1066	506224	SPSVYSRSQYV	P56748	CLD8	CLAUDIN-8.	TJ-Protein, Zellzellkontakt
1060	443878	EFNSYSLTGYV	P57739	CLD2	CLAUDIN-2.	TJ-Protein, Zellzellkontakt
1073	151394	TAKMYAVDTRV	Q9Y5I7	CLD16	CLAUDIN-16 (PARACELLIN-1)	TJ-Protein, Zellzellkontakt
1331	252743	GAFAYEGASFY	P46094	XCR1	CHEMOKINE XC RECEPTOR 1	Calcium Influx
5183	484960	EKSSTMRISYL	P32745	SSR3	SOMATOSTATIN RECEPTOR TYPE 3	Gehirn, G Protein Rezeptor
2664	157382	STFLQQHPAAF	P46695	IEX1	RADIATION-INDUCIBLE IMMEDIATE-EARLY GENE IEX-1	Placenta
5530	263773	TGFTSFGLLKL	P29965	CD40L	CD40 LIGAND	Tumornekrosefaktor
1885	247616	PSPQDLLLVEH	P49771	FLT3L	SL CYTOKINE PRECURSOR	
3503	1,40 E+06	GQFLEELRNPF	Q16653	MOG	MYELIN-OLIGODENDROCYTE GLYCOPROTEIN PRECURSOR	Immunglobulin
2165	2,55 E+06	GGLPRLAESPF	P47871	GLR	GLUCAGON RECEPTOR PRECURSOR	Glucagonrezeptor
833	555998	SYHHPDQDHC	Q00975	CAC1B	VOLTAGE-DEPENDENT N-TYPE CALCIUM CHANNELALPHA-1B SUBUNIT	Calciumkanal
451	787019	PGSWWDQELYY	P20648	ATP4A	POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE ALPHA CHAIN	Kationtransporter
5532	104124	VLSIFLYSNSD	P32971	TNFL8	CD30 LIGAND	Tumornekrose Faktor
5984	135540	YTDDIPLLKEA	Q92537	K0247	HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0247.	Placenta
2019	114934	DTPPSTNCTHV	P47211	GALR1	GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R)	
<b>Enzyme</b>						
2271	132582	LVIEKDLPHYF	P36969	GPX4	PHOSPHOLIPID HYDROPEROXIDE GLUTATHIONE PEROXIDASE	Zytosolisch
1774	192844	SLHQALELDFL	Q99504	EYA3	EYES ABSENT HOMOLOG 3	Phosphatase
4292	770834	FRDFYIADWC	Q16513	PKN2	PROTEIN KINASE C-LIKE 2	Kinase
2340	921041	LGPGDPFSTYV	O60229	KALRN	HUNTINGTIN-ASSOCIATED PROTEIN-INTERACTING PROTEIN	Serin Threonin Kinase
917	236412	QHPYFSDFCPP	Q00535	CDK5	CELL DIVISION PROTEIN KINASE 5	Kinase
1963	700218	PDHWTGLGLNC	Q9Y2I7	FYV1	FYVE FINGER-CONTAINING PHOSPHOINOSITIDE KINASE	Kinase, Endosommembran
105	1,17 E+06	RLYVGPEVDLW	Q13131	AAPK1	5'-AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE, CATALYTIC ALPHA-1 CHAIN	Kinase
1793	185620	RPGVLLRAPFP	P08709	FA7	COAGULATION FACTOR VII PRECURSOR	Serin Protease Blut
1792	166248	LRLELFGCDIY	P12259	FA5	COAGULATION FACTOR V PRECURSOR	Serin Protease Blut

Ergebnisse

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
5855	1,14 E+06	NQEREGIGYPF	P10265	VPK10	HERV-K10 Pro Protein	Protease Homodimer
3480	100214	FGSIKSDWLGC	P08253	MMP2	72 KDA TYPE IV COLLAGENASE PRECURSOR	Metalloprotease bindet Integrin
4978	565891	QHVTEAFQFHF	O43175	SERA	D-3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE	Dehydrogenase, Gehirn Homotetramer
248	249366	GHPLYPFNDPY	P14550	AK1A1	ALCOHOL DEHYDROGENASE	Dehydrogenase
435	281592	TDTNFSDMFWS	P16615	AT2A2	SARCOPLASMIC/ENDOPLAS MIC RETICULUM CALCIUM ATPASE 2	Calcium ATPase
5238	2,02 E+06	ADLPRELFPWE	Q06520	ST2A1	BILE SALT SULFOTRANSFERASE	Sulfotransferase, Zytosol, Galle, Leber
4919	154169	TDTRLTFHFQF	O75897	ST1C4	SULFOTRANSFERASE 1C4	Sulfotransferase, Zytosol
4522	233710	LTGKYPVELEW	Q06203	PUR1	AMIDOPHOSPHORIBOSYL- TRANSFERASE PRECURSOR	Purin Metabolismus
3199	470033	LALNIDCDLLG	O75627	LIPB	PROBABLE LIPOATE- PROTEIN LIGASE B	Eintrag aus Swissprot gelöscht
2179	135444	PTWEGYDPSWN	P26572	MGAT1	ALPHA-1,3-MANNOSYL- GLYCOPROTEIN BETA-1,2-N- ACETYLGLUCOSAMINYL- TRANSFERASE	Transferase
554	274151	SETAIQPSWYF	Q06430	GCNT2	N-ACETYLLACTOSAMINIDE BETA-1,6-N- ACETYLGLUCOSAMINYL TRANSFERASE	Transferase, Gogimembran
1937	262495	VYEDLEGWFQA	Q11130	FUT7	ALPHA-(1,3)- FUCOSYLTRANSFERASE	Fucosyltransferase, Golgi
411	186353	LRDCPDPCIGW	Q13510	ASAH1	ACID CERAMIDASE PRECURSOR	Ceramidase
405	169273	LCWCLREDDPQ	P51690	ARSE	ARYLSULFATASE E PRECURSOR	Arylsulfatase
309	444868	PDLPPFSYHGF	O75106	AOC2	RETINA-SPECIFIC COPPER AMINE OXIDASE PRECURSOR	Oxidase
<b>Sonstige zytosolische Proteine</b>						
4900	148800	NDFQGCPRDP	P29034	S10A2	S100 CALCIUM-BINDING PROTEIN A2	Tumorsuppressor
1380	141351	MYRDPFGNPFA	P98082	DAB2	DISABLED HOMOLOG 2	Clathrin Vesikel CSF-1 Signaltransduktion
1578	120651	GNPSEFFVDVM	O14641	DVL2	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-2	Enthält PDZ-Domänen, Wnt Pfad
1577	2,48 E+06	GNPCEFFVDIM	O14640	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1	Enthält PDZ-Domänen, Wnt Pfad
5647	130145	SGPGNFFFQFG	Q99615	DNJC7	TETRATRIPEPTIDE REPEAT PROTEIN 2	Chaperon
4403	109463	LISFLIFLIVG	P04156	PRIO	MAJOR PRION PROTEIN PRECURSOR	Prionprotein
3418	1,41 E+06	LIYDSSLCDLF	Q13296	SG2A2	MAMMAGLOBIN A PRECURSOR	Sekretoglobin, Brustkrebs
1979	1,06 E+06	VWYMDYDAFLG	O95479	G6PE	GDH/6PGL ENDOPLASMIC BIFUNCTIONAL PROTEIN PRECURSOR	Endoplasmatisches Retikulum
4034	402471	KQDWSSCPDIF	P22059	OSBP1	OXYSTEROL-BINDING PROTEIN	Zytosol, Golgimembran
5741	176405	MKVQMLRESPF	P55916	UCP3	MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN 3	Mitochondrium, Membran, Atmungskette
<b>Sekretierte Proteine</b>						
1145	174302	EFAEDIFLNGC	P01031	CO5	COMPLEMENT C5 PRECURSOR	Sekretiert ins Blut
956	459333	SYAAWIDSVLA	P00746	CFAD	COMPLEMENT FACTOR D PRECURSOR	extrazellulär
2880	219921	VHTDYIVPNLF	Q06033	ITI3	INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR HEAVY CHAIN H3 PRECURSOR	Sekretiert

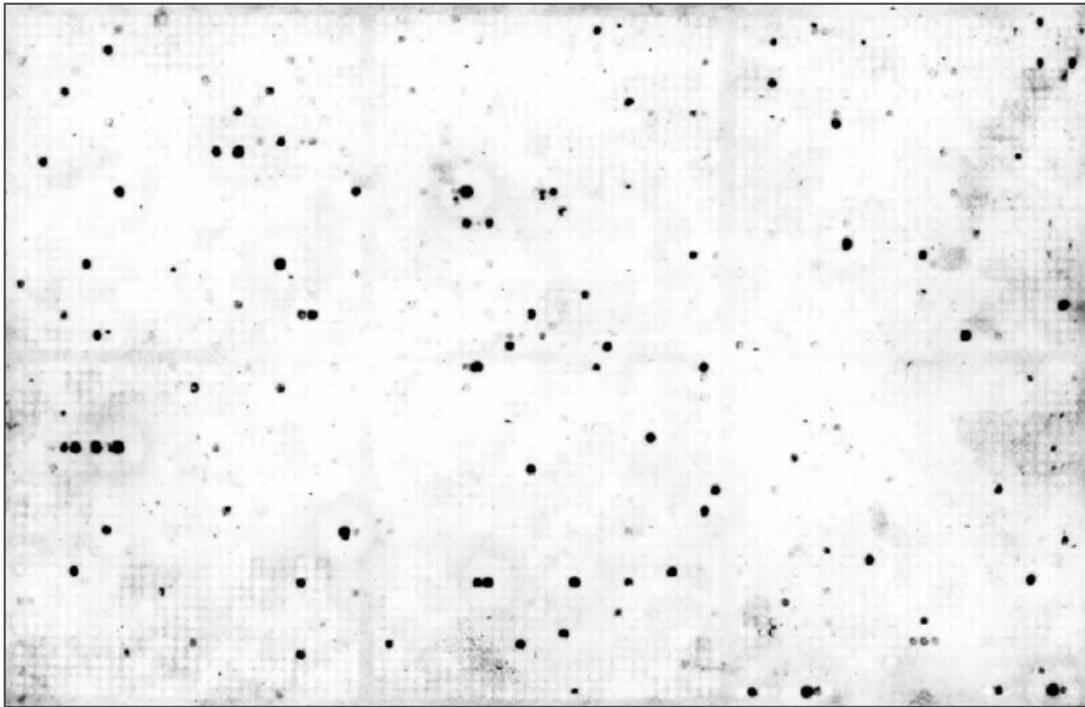
## Ergebnisse

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
2878	963941	AYTDYIVPDIF	P19827	ITIH1	INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR HEAVY CHAIN H1 PRECURSOR	Sekretiert
3512	108042	LSEMLPQHAAK	P12872	MOTI	MOTILIN PRECURSOR	Sekretiert
3836	531603	YNFQSEHPYFG	O95158	NXPH4	NEUREXOPHILIN 4	Sekretiert
<b>Kernproteine</b>						
1951	102654	GLSVDRLVNGE	Q14488	FOXG1	FORKHEAD PROTEIN G1C	Gehirnentwicklung, Transkriptionsrepressor
5482	251908	ELYLQHLTALH	P08918	LAP2A	THYMOPOIETIN	Nukleus, T Zellentwicklung
505	106785	GCLREWCDAFL	O75531	BAF	BARRIER-TO-AUTOINTEGRATION FACTOR	Nukleus Aufbau
1524	670745	WLLQKNPQLGH	Q07864	PDOE1	DNA POLYMERASE EPSILON, CATALYTIC SUBUNIT A	DNA Polymerase
3647	443703	KSLQAKLERLH	O75694	NU155	NUCLEAR PORE COMPLEX PROTEIN NUP155	Kernmembranprotein
3851	1,63 E+06	IDKLFLDTLPF	P43354	NR4A2	ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR NURR1	Kernrezeptor
3850	827826	IDKIFMDTLPF	P22736	NR4A1	ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR HMR	Kernrezeptor
2665	344685	SSMETSPDFFF	Q16666	IF16	GAMMA-INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN IFI-16	Transkriptionsrepressor
<b>Transkriptionsfaktoren</b>						
6122	137963	DIILSLFLNDM	Q9UIE0	ZN230	ZINC FINGER PROTEIN 230	Transkriptionsfaktor
6116	238471	DIILSLFLNDT	Q9UK11	ZN223	ZINC FINGER PROTEIN 223	Transkriptionsfaktor
6084	138055	DILLSLFLNDT	Q12901	ZN155	ZINC FINGER PROTEIN 155	Transkriptionsfaktor
2036	192369	RPDSWCALALA	Q92908	GATA6	TRANSCRIPTION FACTOR GATA-6	Transkriptionsfaktor
2431	238587	HCVGSWSPAFW	Q99801	NKX31	HOMEODOMAIN PROTEIN NKX-3.1	Transkriptionsfaktor
4346	389894	GLVLENSDSLQ	P55347	PKNX1	HOMEODOMAIN PROTEIN PKNX1	Transkriptionsfaktor
2430	364795	LASPALVSWNW	O15522	NKX28	HOMEODOMAIN PROTEIN NKX-2.8	Transkriptionsfaktor
3189	432854	SWLDEVDHAQF	Q9UBR4	LHX3	LIM/HOMEODOMAIN PROTEIN LHX3	Aktiviert $\alpha$ -Glycoprotein Gen
1755	1,37 E+06	NPHPYNEGYVY	P50549	ETV1	ETS TRANSLOCATION VARIANT 1	Transkriptionsaktivator
576	457067	PVDFSDLPWPL	O00327	BMAL1	BMAL1 PROTEIN	Transkriptionsaktivator
1599	292435	CDFGDLTPLDF	Q01094	E2F1	TRANSCRIPTION FACTOR E2F1	Transkriptionsfaktor
5340	423701	MGQRMFEDLFE	P29083	T2EA	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR IIE, ALPHA SUBUNIT	Transkriptionsfaktor
<b>sonstige Kernproteine</b>						
3371	136220	VNASRTRITFV	P33993	MCM7	DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM7	DNA replikation
4813	216469	FCFITFNQEEP	P07029	HNRPD	HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEO-PROTEIN UP2	Ribonukleprotein
4789	147904	KLVPVHLSIL	Q93091	RNAS6	RIBONUCLEASE K6 PRECURSOR	Ribonuklease
4990	175540	SPHYFSPFRPY	Q13242	SFRS9	SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 9	Splicing Faktor
2673	424651	DPQYFEFEFEA	Q13347	EIF3I	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 2	Translationsfaktor
2672	270368	GGYVQDYEDFM	O75822	EIF3J	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 1	Translationsfaktor
5689	463182	DPDSYHRRDFW	P26368	U2AF2	SPLICING FACTOR U2AF 65 KDA SUBUNIT	Kerntransport RNA
<b>unbekannt</b>						
6021	168541	SFYDLEADQYC	O60810	PRAM4	HYPOTHETICAL PROTEIN DJ845O24.2	Präme family



## Ergebnisse

Die PDZ 2-Domäne wurde ebenfalls mit der 6223 Peptide umfassenden humanen Peptidbibliothek inkubiert (Abb. 16).



**Abb. 16: Bindungspartner von ZO-1 PDZ 2 in der 6322 C-Termini umfassenden humanen Peptidbibliothek**

In schwarz sind die 92 Peptidpunkte zu sehen, an die die ZO-1 PDZ 2-Domäne gebunden hat. Die PDZ 2-Domäne wurde mit einem HRP konjugierten Antikörper gegen den Strep-tag nachgewiesen. Die Detektion erfolgte im Lumi-Imager für eine Minute mit Luminol (Pierce).

Die Inkubation der PDZ 2 mit der humanen Bibliothek ergab 92 Interaktionen (Abb. 16). Der Schwellenwert für die Detektion als Bindungspartner wurde auf 79000 BLU festgelegt. 39 Peptide (kursiv gesetzt) wurden von beiden PDZ-Domänen erkannt. Ein Protein wurde mittlerweile aus der Swissprot Datenbank gelöscht. Bei Punkt 4667 Restin (rot) konnte das Signal nicht eindeutig dem Peptidpunkt zugeordnet werden. Die Ergebnisse sind in

## Ergebnisse

Tab. **26** dargestellt. Wie in der kleinen Bibliothek wurden Connexine als Bindungspartner für die PDZ 2-Domäne detektiert. Die Bindung an Connexin 43 wurde reproduziert. Zusätzlich wurden Connexin 50, 46 und 40 von der PDZ 2 erkannt. Obwohl Connexin 45 auf der Membran enthalten war, wurde es nicht detektiert. JAM B und C waren in der Bibliothek nicht enthalten.



Ergebnisse

**Tab. 26: Zusammenstellung der Bindungspartner von ZO-1 PDZ 2**

Aus einer Bibliothek mit 6223 Peptiden deren Sequenz den letzten 11 Aminosäuren von humanen Proteinen entspricht, wurden 92 Peptide detektiert.. Die Detektion erfolgte nach Inkubation der Bibliothek mit der PDZ 2 Domäne durch Identifizierung des Strep-tags mittels eines Antikörpers. Das rot unterlegte Peptid konnte nicht mit Sicherheit dem Punkt 4667 Restin zugeordnet werden. Grün unterlegte Peptide sind Kandidaten für weitere Untersuchungen. Kursiv gesetzte Proteine wurden von PDZ 1 und 2 erkannt.

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
<b>Membranproteine</b>						
1317	276155	SSRPRPDDLEI	P17302	CXA1	GAP JUNCTION ALPHA-1 PROTEIN (CONNEXIN 43)	Bilden Gap junctions, Kommunikation zwischen Zellen
1318	1,04 E+06	SGRARPEDLAI	Q9Y6H8	CXA3	GAP JUNCTION ALPHA-3 PROTEIN (CONNEXIN 46)	Bilden Gap junctions, Kommunikation zwischen Zellen
1322	1,89 E+06	SSRARSDDLTV	P48165	CXA8	GAP JUNCTION ALPHA-8 PROTEIN (CONNEXIN 50)	Bilden Gap junctions, Kommunikation zwischen Zellen
1320	861578	SSKARSDDLTV	P36382	CXA5	GAP JUNCTION ALPHA-5 PROTEIN (CONNEXIN 40)	Bilden Gap junctions, Kommunikation zwischen Zellen
3503	604019	GQFLEELRNPF	Q16653	MOG	MYELIN-OLIGODENDROCYTE GLYCOPROTEIN PRECURSOR	Immunglobulin
3120	84065	YYFCLQHDNFP	P06315	KV501	IG KAPPA CHAIN V REGION EV15 PRECURSOR	Immunglobulin V region
3178	805019	IMENKMCDLTV	P48357	LEPR	LEPTIN RECEPTOR PRECURSOR	Immunglobulin-domäne
3959	125671	GRGDDFSWEQW	O15243	OBRG	LEPTIN RECEPTOR GENE-RELATED PROTEIN	OB-RGRP Familie
1137	106175	AAAATASSLLI	P26992	CNTFR	CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR RECEPTOR ALPHA PRECURSOR	Lipidanker
2165	288499	GGLPRLAESPF	P47871	GLR	GLUCAGON RECEPTOR PRECURSOR	Glucagon Rezeptor
1702	461862	MLHLHGTGIQV	Q15375	EPHA7	EPHRIN TYPE-A RECEPTOR 7 PRECURSOR	Membranrezeptor
3859	1,13 E+06	SVIANQDPIAV	Q02297	NRG1	PRO-NEUREGULIN-1 PRECURSOR	Rekrutiert ERBB1+2
833	127956	SYHHPDQDHW	Q00975	CAC1B	VOLTAGE-DEPENDENT N-TYPE CALCIUM CHANNEL ALPHA-1B SUBUNIT	Calciumkanal
451	238285	PGSWWQELY	P20648	ATP4A	POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE ALPHA CHAIN	Kation transport
5901	564261	DIQSYTTDFSF	O14609	XKRY	TESTIS-SPECIFIC XK RELATED PROTEIN Y	Membranprotein
<b>Enzyme</b>						
4046	357226	HVTRRTPDYFL	P05323	PP2AA	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A, CATALYTIC SUBUNIT, ALPHA ISOFORM	Phosphatase
4381	249606	PSKKPVADYFL	P33172	PP4C	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 4	Phosphatase
1774	107388	SLHQALELDFL	Q99504	EYA3	EYES ABSENT HOMOLOG 3	Phosphatase
3055	176944	GFSYFGEDLMP	Q02156	KPCE	PROTEIN KINASE C, EPSILON TYPE	Proteinkinase C
4292	211902	FRDFDYIADWC	Q16513	PKN2	PROTEIN KINASE C-LIKE 2	Proteinkinase
4232	136597	DSSDLVEDSFL	P16234	PGFRA	ALPHA PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR PRECURSOR	Tyrosinkinase, Membranprotein, Immunglobulin-domäne

Ergebnisse

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
2996	154344	PDDNSGWDIDF	Q13976	KGP1A	CGMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1, ALPHA ISOZYME	Kinase
917	101203	QHPYFSDFCPP	Q00535	CDK5	CELL DIVISION PROTEIN KINASE 5	Kinase
105	457600	RLYVGPEVDLW	Q13131	AAPK1	5'-AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE, CATALYTIC ALPHA-1 CHAIN	Kinase
1963	101808	PDHWTGLGLNC	Q9Y217	FYV1	FYVE FINGER-CONTAINING PHOSPHOINOSITIDE KINASE	Kinase, Endosommembran
5855	270710	NQEREGIGYPF	P10265	VPK10	RETROVIRUS-RELATED PROTEASE	Protease, Homodimer
5566	109741	PIMYPDPYCVF	P29144	TPP2	TRIPEPTIDYL-PEPTIDASE II	Peptidase
793	845616	GIADSVSSIFV	P43234	CATO	CATHEPSIN O PRECURSOR	Endopeptidase
4978	340108	QHVTEAFQFHF	O43175	SERA	D-3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE	Dehydrogenase, Gehirn Homotetramer
248	137015	GHPLYPFNDPY	P14550	AK1A1	ALCOHOL DEHYDROGENASE	Dehydrogenase
3158	662105	TLWNIQKDLIF	P07864	LDHC	L-LACTATE DEHYDROGENASE X CHAIN	Oxidoreduktase, homotetramer
1000	264432	ELLIKNEDILF	P15882	CHIN	N-CHIMAERIN	GTPase aktiviert p21-rac, Zinkfinger, Neuronen
5980	438054	SGFTIVSPLDI	Q92609	TBCD5	HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0210 TBC1 domain family member 5	GTPase aktiviert Rab Familie
4420	241994	KQEGTPEGLYL	Q03527	PRS4	26S PROTEASE REGULATORY SUBUNIT 4	Atpase, Zytosol, Nuklus
437	1,17 E+06	VSSTSSSFLEV	P98194	AT2C1	CALCIUM-TRANSPORTING ATPASE TYPE 2C, MEMBER 1	ATPase, Golgimembran
435	285161	TDTNFSDMFWS	P16615	AT2A2	SARCOPLASMIC/ENDOPLASMIC RETICULUM CALCIUM ATPASE 2	ATPase
3149	204290	QIDDLYSTIKV	P33121	ACSL1	LONG-CHAIN-FATTY-ACID-COA LIGASE 2	Ligase, Mitochondrium
409	308123	VPKPGDGLTI	P11245	ARY2	ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASE 2	Transferase
1937	105552	VYEDLEGWFQA	Q11130	FUT7	ALPHA-(1,3)-FUCOSYLTRANSFERASE	Transferase, Golgi
309	280807	PDLPPFSYHGF	O75106	AOC2	RETINA-SPECIFIC COPPER AMINE OXIDASE PRECURSOR	Oxidase, Retina
4919	99775	TDTRLTFHFQF	O75897	ST1C4	SULFOTRANSFERASE 1C2	Transferase, Zytosol
5238	709665	ADLPRELFPWE	Q06520	ST2A1	BILE SALT SULFOTRANSFERASE	Transferase, Zytosol, Galle, Leber
3199	295268	LALNIDCDLLG	O75627	LIPB	PROBABLE LIPOATE-PROTEIN LIGASE B	Gelöscht aus swissprot
<b>Sonstige zytosolische Proteine</b>						
5630	83169	ISSVEDFTEFV	P49815	TSC2	TUBERIN	Zytosol membranassoziiert Tumorsuppressor
4667	111518	WATNCNDDETF	P30622	CLIP1	RESTIN	Zytoskelet
5865	115982	GQGLEVYNWYD	Q9NNW5	WDR6	WD-REPEAT PROTEIN 6	Enthält 11 WD Wiederholungen
1577	314182	GNPCEFFVDIM	O14640	DVL1	SEGMENT POLARITY PROTEIN DISHEVELLED HOMOLOG DVL-1	Enthält PDZ-Domänen, Wnt Pfad
3418	892109	LIYDSSLCDLF	Q13296	SG2A2	MAMMAGLOBIN A PRECURSOR	Sekretoglobin, Brustkrebs
4018	461464	EGTGDLDEFDF	Q13438	OS9	PROTEIN OS-9 PRECURSOR	ER assoziierter Proteinabbau

Ergebnisse

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
1979	172230	VWYMDYDAFLG	O95479	G6PE	GDH/6PGL ENDOPLASMIC BIFUNCTIONAL PROTEIN PRECURSOR	Endoplasmatisches Retikulum
3584	579899	PQPSTSSGWFF	P55157	MTP	MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN, LARGE SUBUNIT PRECURSOR	Endoplasmatisches Retikulum, Transport von Triglyceriden
4939	1,01 E+06	PGGDCSSDIWI	Q13228	SBP1	SELENIUM-BINDING PROTEIN 1	Nukleus, Zytosol
2105	79911	VAYSGENTFGF	O08765/P60520	GBRL2	GANGLIOSIDE EXPRESSION FACTOR 2	Golgi, Proteintransport
5574	131943	GLGPGGPGIFF	Q15643	TRIPB	THYROID RECEPTOR INTERACTING PROTEIN 11	Golgimembran
4034	189744	KQDWSSCPDIF	P22059	OSBP1	OXYSTEROL-BINDING PROTEIN	Zytosol, Golgimembran
554	274151	SETAIQPSWYF	Q06430	GCNT2	N-ACETYLLACTOSAMINIDE BETA-1,6-N-ACETYLGLUCOSAMINYL TRANSFERASE	Golgimembran
<b>Sekretierte Proteine</b>						
955	124277	EKLQDEDLGFL	P00751	CFAB	COMPLEMENT FACTOR B PRECURSOR	Sekretiert, Blut, Serin Protease
775	348851	PLAPVHNPIV	P05814	CASB	BETA CASEIN PRECURSOR	Sekretiert Muttermilch
5151	887350	KQKDIDKDLVI	P09486	SPRC	SPARC PRECURSOR	Sekretiert
4415	104054	PPQGDKSRSPR	P04281	PRP5	BASIC PROLINE-RICH PEPTIDE IB-1	Sekretiert
2878	207864	AYTDYIVPDIF	P19827	ITIH1	INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR HEAVY CHAIN H1 PRECURSOR	Sekretiert
3836	589265	YNFQSEHPYFG	O95158	NXPH4	NEUREXOPHILIN 4	Sekretiert
1145	119345	EFAEDIFLNGC	P01031	CO5	COMPLEMENT C5 PRECURSOR	Sekretiert, Blut
956	263675	SYAAWIDSVLA	P00746	CFAD	COMPLEMENT FACTOR D PRECURSOR	Sekretiert Protease
<b>Kernproteine</b>						
229	218131	PFPLDTSSGFL	P35869	AHR	AH RECEPTOR	Kernrezeptor
2761	443316	VQDGAPGTFNF	P52292	IMA2	IMPORTIN ALPHA-2 SUBUNIT	Kerntransport
2763	362199	SANVPTEGFQF	O00629	IMA4	IMPORTIN ALPHA-4 SUBUNIT	Kerntransport
3647	384880	KSLQAKLERLH	O75694	NU155	NUCLEAR PORE COMPLEX PROTEIN NUP155	Kernmembranprotein
3851	914627	IDKLFLDTLPF	P43354	NR4A2	ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR NURR1	Kernrezeptor
3850	480004	IDKIFMDTLPF	P22736	NR4A1	ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR HMR	Kernrezeptor
1524	670745	WLLQKNPQLGH	Q07864	DPOE1	DNA POLYMERASE EPSILON, CATALYTIC SUBUNIT A	DNA Polymerase
576	365807	PVDFSDLPWPL	O00327	BMAL1	BMAL1 PROTEIN	Transkriptionsaktivator
<b>Transkriptionsfaktoren</b>						
6098	143273	HSGEKSESISV	Q15776	ZN192	ZINC FINGER PROTEIN 192	Transkriptionsfaktor
6161	84580	ALSSNFNEWYV	Q15915	ZIC1	ZINC FINGER PROTEIN ZIC1	Transkriptionsfaktor
6162	99465	GLSSNFNEWYV	O95409	ZIC2	ZINC FINGER PROTEIN ZIC2	Transkriptionsfaktor
4253	196366	YLVEWGGGGIF	O43189	PHF1	PHD FINGER PROTEIN 1	Zinkfingerprotein
2430	110857	LASPALVSWNW	O15522	NKX28	HOMEBOX PROTEIN NKX-2.8	Transkriptionsfaktor
3864	188554	PGSGDPSHLFL	P54845	NRL	NEURAL RETINA-SPECIFIC LEUCINE ZIPPER PROTEIN	Transkriptionsfaktor

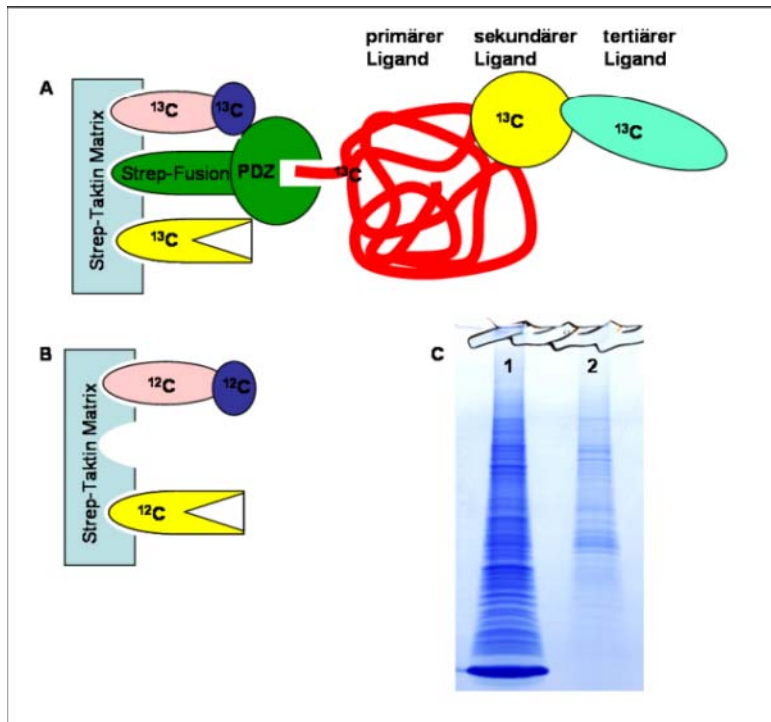
## Ergebnisse

Punkt	BLU	Sequenz	Swissprot Eintrag	Abkürzung	Proteinbeschreibung	Anmerkung
3189	154483	SWLDEV DHAQF	Q9UBR4	LHX3	LIM/HOMEBOX PROTEIN LHX3	Aktiviert $\alpha$ -glycoprotein Gen
933	138900	ASREEPIEWEF	P39880	CUX1	CCAAT DISPLACEMENT PROTEIN	Homeobox Protein Mamalian development
5340	83293	MGQRMFEDLFE	P29083	T2EA	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR IIE, ALPHA SUBUNIT	Transkriptionsfaktor
1755	322049	NPHPYNEGYYVY	P50549	ETV1	ETS TRANSLOCATION VARIANT 1	Transkriptionsaktivator
1599	974760	CDFGDLTPLDF	Q01094	E2F1	TRANSCRIPTION FACTOR E2F1	Transkriptionsfaktor
<b>sonstige Kernproteine</b>						
1631	251118	QSMDVAAFNKI	P24534	EF1B	ELONGATION FACTOR 1-BETA	
2392	328052	YISYLNHVLDV	Q02575	HEN1	HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 1	DNA Binder vielleicht Zelltypbestimmung im Nervensystem
4384	424335	PGKKPTPSLLI	Q12972	PP1R8	NUCLEAR INHIBITOR OF PROTEIN PHOSPHATASE-1	Phosphatase, teils auch Zytosol
4554	316841	TEVLKTHGLLV	P40429	RL13A	60S RIBOSOMAL PROTEIN L13A	Ribosomales Protein
2673	222434	DPQYFEFEFEA	Q13347	EIF3I	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 2	Translationsfaktor
2672	140274	GGYVQDYEDFM	O75822	EIF3J	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 1	Translationsfaktor
5689	232622	DPDSYHRRDFW	P26368	U2AF2	SPLICING FACTOR U2AF 65 KDA SUBUNIT	Kerntransport RNA
2665	2,25 E+06	SSMETSPDFFF	Q16666	IF16	GAMMA-INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN IFI-16	Transkriptionsrepressor
<b>unbekannt</b>						
6021	98101	SFYDLEADQYC	O60810	PRAM4	HYPOTHETICAL PROTEIN DJ845O24.2	Prame Familie

### 3.1.5 Identifizierung von Bindungspartnern der PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 aus Epithelzellen mit ESI MS/MS

In einem *pull-down*-Experiment mit PDZ-Domänen aus ZO-1 wurden Proteine aus einem NRC-Zelllysate angereichert. Im *pull-down*-Experiment der PDZ-Domänen wurden  $^{13}\text{C}$  markierte Proteine eingesetzt, in der Kontrolle unmarkierte Proteine. Um Proteine zu erkennen, die durch die PDZ angereichert wurden, wurde das Verhältnis zwischen  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  markierten Peptiden quantifiziert. Im ersten Experiment wurden 602 Proteine im Ansatz der PDZ 1-Domäne identifiziert und 550 Proteine für die PDZ 2-Domäne. Eine Quantifizierung der Proteine war nicht möglich, da die Markierung mit schwerem Kohlenstoff nicht ausreichend war. Im zweiten Experiment wurden 650 verschiedene Proteine im *pull-down*-Experiment der PDZ 1-Domäne und 662 Proteine im *pull-down*-Experiment der PDZ 2-Domäne identifiziert (s. Anhang). Zur korrekten Quantifizierung der Peptide wurden der Markierungsgrad der Proteine und die eingesetzten Mengen an Zelllysate einbezogen. Der Markierungsgrad der Proteine mit  $^{13}\text{C}$ -Arg/Lys wurde auf 90% bestimmt. Das Verhältnis, indem die Zelllysate im *pull-down*-Experiment eingesetzt wurden, betrug  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C} = 1,26$ .

## Ergebnisse



**Abb. 17: Reinigung von PDZ assoziierten Proteinkomplexen aus Rattenepithelzellen**

**A**  $^{13}\text{C}$  markierte Proteine binden an Strep-Taktin und immobilisierte PDZ-Domänen **B** In der Kontrolle binden Proteine an die Strep-Taktin Matrix **C** Polyacrylamidgel von Elutionsfraktion der PDZ 2-Domäne (C, Spur 1) verglichen mit der Kontrolle (C, Spur 2). Die Inkubation mit gleichen Mengen NRC Zelllysate zeigt, dass die PDZ-Domäne zu einer Anreicherung von Proteinen führt.

### 3.1.6 Elf Proteine konnten in der Peptidbibliothek und in Rattenepithelzellen als Bindungspartner der PDZ-Domänen identifiziert werden.

Proteine, die sowohl in der Peptidbibliothek als auch aus Epithelzelllysate als Bindungspartner der PDZ-Domäne identifiziert wurden, wurden als Kandidaten für eine Interaktion mit dem Zellkontaktkomplex herausgesucht (Tab. 27).

Dazu gehörten als Interaktionspartner der PDZ 1-Domäne, die Proteine *DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM7* und das heterogene nukleare Ribonukleoprotein UP2 (HNRPD). Beide Proteine sind im Zellkern an der Genexpression beteiligt. Zwei Initiationsfaktoren für die Translation EIF3I und EIF3J kamen als Bindungspartner für beide PDZ-Domänen vor.

Bei der PDZ 2-Domäne gab es eine Schnittmenge von sieben Proteinen. Interessant ist die Interaktion der PDZ 2-Domäne mit zwei Phosphatasen, wovon eine, die Serin/Threonin Phosphatase 2A TJ-Proteine dephosphoryliert. Bei den Proteinen ribosomales 60S Protein L13A (RL13A), Elongationsfaktor 1-BETA, 26S Protease mit regulatorischer Untereinheit 4, dem *Splicingfactor* U2AF (U2AF2) und der Tripeptidylpeptidase II konnte aus der Literatur kein Zusammenhang mit den TJ hergestellt werden. Die Quantifizierung der Proteine aus der zweiten Proteomanalyse ergab eine Anreicherung der Proteine HNRPD als Bindungspartner der PDZ 1-Domäne sowie EIF3I, EIF3J, RL13A und U2AF2 für die PDZ 2-Domäne. Quantifizierungswerte von 1 bedeuten, dass gleich viel Protein an die Kontrolle aus Streptaktin-Sepharose gebunden hat, wie an die PDZ-Domänen enthaltende Probe. Die Quantifizierungswerte wurden um den Markierungsgrad und das Mischungsverhältnis korrigiert.

## Ergebnisse

**Tab. 27: Proteine, die sowohl in den Peptidbibliotheken als auch den Rattenepithelzellen als Bindungspartner der PDZ-Domänen identifiziert wurden.**

11 Proteine wurden als Bindungspartner der PDZ-Domänen aus Rattenepithelzellen und in Peptidbibliotheken identifiziert. Die Tabelle enthält Informationen über die C-terminalen Aminosäuren und die Funktion der Proteine sowie die Quantifizierungswerte der Massenspektrometrischen SILAC Experimente dabei heißt n.Q. = Nicht quantifiziert; Exp.= Experiment

Sequenz	Swiss-prot Eintrag	Abkürzung	Protein-beschreibung	Proteom-analyse	Quantifizierungs-wert ( <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C)	Anzahl der Peptide in Exp.2	Anmerkung
<b>PDZ 1</b>							
VNASRTRITFV	P33993	MCM7	DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM7	1+2	1,18	2	DNA Replikation
FCFITFNQEEP	P07029	HNRPD	heterogenes nukleares Ribonukleoprotein UP2	1+2	3,03	3	Ribonukleoprotein
DPQYFEFEFEA	Q13347	EIF3I	Initiationsfaktor 3 Untereinheit 2	2	0,84	7	Translationsfaktor
GGYVQDYEDFM	O75822	EIF3J	Initiationsfaktor 3 Untereinheit 1	2	0,84	5	Translationsfaktor
<b>PDZ 2</b>							
HVTRRTPDYFL	P05323	P2AA	Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A, katalytische Untereinheit, α-Isoform	1+2	1,96	11	Phosphatase
PSKKPVADYFL	P33172	PPP4	Serin/Threonin Protein Phosphatase 4	1+2	n.Q.	1	Phosphatase
QSM DVAAFNKI	P24534	EF1B	Elongationsfaktor 1-β	1+2	1,75	2	Elongationsfaktor
DPQYFEFEFEA	Q13347	EIF3I	Initiationsfaktor 3 Untereinheit 2	2	4,24	15	Translationsfaktor
GGYVQDYEDFM	O75822	EIF3J	Initiationsfaktor 3 Untereinheit 1	2	5,34	8	Translationsfaktor
PIMYPPDYCVF	P29144	TPP2	Tripeptidyl-Peptidase II	1	n.Q.	n.Q.	Peptidase
TEVLKTHGLLV	P40429	RL13A	ribosomales 60S Protein L13A	1+2	8,41	20	Ribosomales Protein
KQEGTPEGLYL	Q03527	PRS4	26S Protease mit regulatorischer Untereinheit 4	1+2	0,99	4	ATPase, Zytosol, Nukleus
DPDSYHRRDFW	P26368	U2AF2	Splicingfactor U2AF 65 kDa Untereinheit	2	7,29	13	Kerntransport RNA

### 3.1.7 Einfluss der Serin/Threonin Phosphorylierung auf die Bindungseigenschaften der PDZ-Domänen

Eine Möglichkeit die Bindungseigenschaften von Proteinen zu beeinflussen, ist die Phosphorylierung. Mit dem Programm NetPhosK wurden Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Seitenketten identifiziert, die phosphoryliert sein könnten. Das Programm NetPhosK (Blom et al. 2004) suchte nach Erkennungssequenzen für die Kinasen PKA, PKC, PKG, CKII, Cdc2, CaM-II, ATM, DNA PK, Cdk5, p38 MAPK, GSK3, CKI, PKB, RSK, INSR, EGFR und Src. Phosphorylierungsstellen, die mit einer Wahrscheinlichkeit größer 0,5 auf einer Skala von 0,0-1,0 erkannt wurden, sind in Tab. dargestellt.

## Ergebnisse

Für die PDZ 1 wurden fünf vermeintliche Phosphorylierungsstellen identifiziert. Vier davon passen zur Konsensussequenz der Proteinkinase C. In der Sequenz der PDZ 2-Domäne wurden sieben vorraussichtlich phosphorylierte Aminosäuren identifiziert. Davon sind ebenfalls vier Aminosäuren wahrscheinliches Ziel der Proteinkinase C. Das Programm unterscheidet nicht zwischen den einzelnen PKC-Isoformen. Deshalb wurde die Phosphorylierung durch die Isoformen der Proteinkinase C im Kapitel 3.1.7.1 näher untersucht.

**Tab. 28: Potenzielle Phosphorylierungsstellen in PDZ 1 und 2 und dazugehörige Kinasen, identifiziert durch NetPhosK**

Fett markierte Aminosäuren wurden auch mit NetPhos 2.0 phosphoryliert vorhergesagt. Rote Aminosäuren wurden *in vitro* durch PKC  $\alpha$  phosphoryliert.

PDZ 1			PDZ2		
Putative Phosphorylierungsstelle	Kinase	Wahrscheinlichkeit	Putative Phosphorylierungsstelle	Kinase	Wahrscheinlichkeit
Thr29	PKC	0,68	Thr192	PKC	0,68
Thr56	PKC	0,62	<b>Ser208</b>	Cdc2	0,51
Ser86	CKII	0,50	Ser216	DNAPK	0,58
<b>Ser102</b>	PKC	0,81	Thr239	PKC	0,69
<b>Thr109</b>	PKC	0,92	<b>Ser245</b>	DNAPK CKI	0,57 0,60
			Thr247	PKC	0,52
			Thr251	PKC	0,57

Für die PDZ 1-Domäne wurden zwei Phosphorylierungsstellen vorhergesagt. Bei der PDZ 2-Domäne wurden vier Serine und ein Tyrosin als putative Phosphorylierungsstellen vorhergesagt (Tab. 29). Das Programm NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999) suchte nach Homologien in der PDZ Aminosäuresequenz zu Peptiden in einer Datenbank, die in Zellen als phosphoryliert gefunden wurden.

**Tab. 29: Phosphorylierungsvorhersage aufgrund von Sequenzhomologien zu phosphorylierten Peptiden für ZO-1 PDZ 1 und PDZ 2 mit NetPhos 2.0**

Fett gedruckte Aminosäuren wurden mit NetPhosK ebenfalls als Phosphorylierungsstellen identifiziert. Thr109 und Ser208 (rot markiert) wurden *in vitro* als Phosphorylierungsstellen der PKC  $\alpha$  identifiziert.

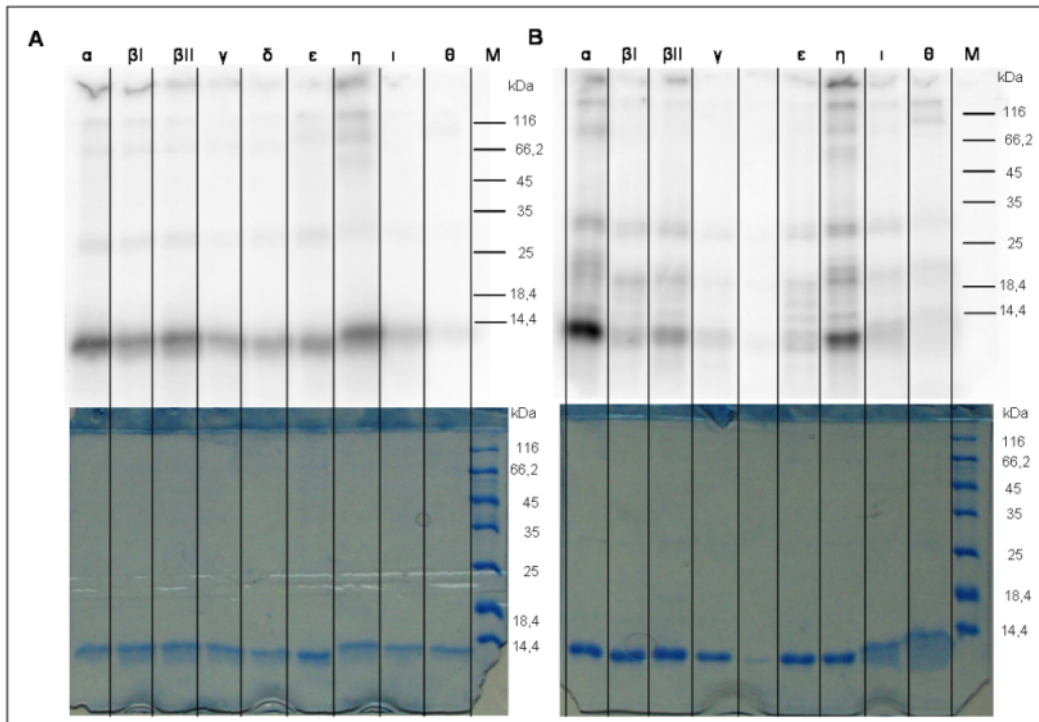
PDZ 1		PDZ 2	
Putative Phosphorylierungsstelle	Wahrscheinlichkeit	Putative Phosphorylierungsstelle	Wahrscheinlichkeit
<b>Ser102</b>	0,998	Ser196	0,988
<b>Thr109</b>	0,832	<b>Ser208</b>	0,583
		<b>Ser245</b>	0,990
		Ser255	0,741
		Tyr202	0,589

### 3.1.7.1 *In vitro* Phosphorylierung der PDZ-Domänen durch Proteinkinase C Isoformen

Für einzelne Isoformen der Proteinkinase C wurde eine Phosphorylierung von TJ-Proteinen in der Literatur beschrieben (Gonzalez-Mariscal et al. 2008). Das Programm NetPhosK (Tab. ) prognostiziert eine Phosphorylierung der PDZ-Domänen durch die PKC. Die Phosphorylierung der PDZ-Domänen 1 und 2 aus ZO-1 durch verschiedenen PKC-Isoformen wurde mit radioaktiv markiertem Phosphat *in vitro* getestet.



## Ergebnisse



**Abb. 18: Die PDZ 1 und PDZ 2-Domänen werden *in vitro* durch Proteinkinase C Isoenzyme phosphoryliert**

Die PDZ 1 und 2-Domänen wurde mit 9 verschiedenen PKC-Isoformen und radioaktivem ATP umgesetzt. **A** Die PDZ 1-Domäne zeigt in allen Spuren auf der Höhe der PDZ-Domänen eine radioaktive Markierung mit  $^{32}\text{P}$ . Die stärkste Phosphorylierung ist in der Spur mit PKC $\alpha$  und PKC $\eta$  zu erkennen. Im unteren Teil der Abbildung ist dasselbe Gel in der Coomassie Färbung zu sehen. Man erkennt, dass in allen Spuren etwa gleich viel PDZ 1 enthalten war. **B** Die Abbildung zeigt die Phosphorylierung der PDZ 2-Domäne durch die PKC-Isoformen. Die stärkste Phosphorylierung ist bei den PDZ-Domänen, die mit PKC $\alpha$  und PKC $\eta$  umgesetzt wurden, zu erkennen.

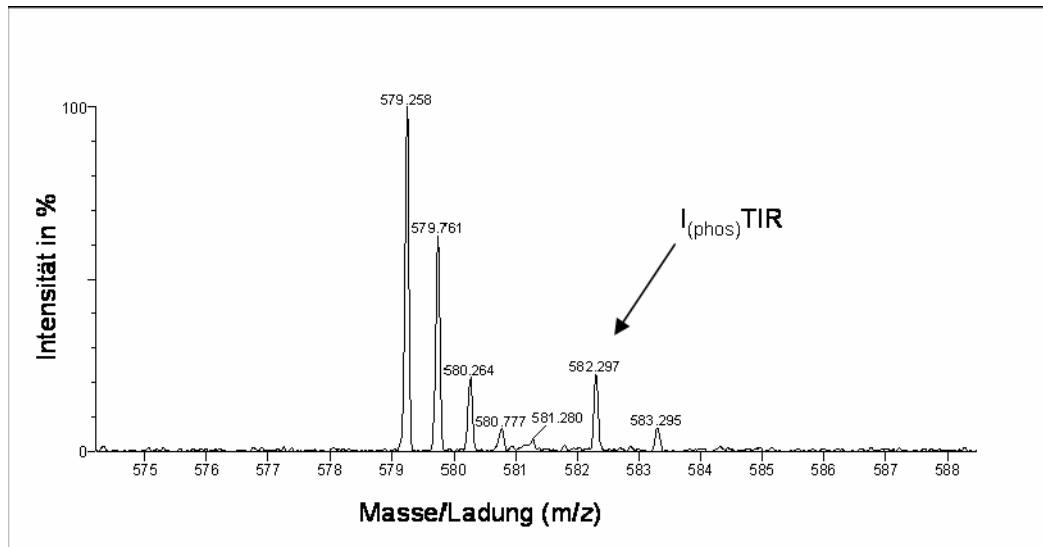
Bei gleicher Konzentration der PDZ-Domäne und Aktivität der Kinasen, ist die Stärke des radioaktiven Signals ein Maß für den Phosphorylierungsgrad. In allen Fraktionen war auf Höhe der PDZ-Domänen ein Signal zu erkennen. Die stärkste Phosphorylierung verursachten PKC $\alpha$  und PKC $\eta$  (Abb. 18). Die Gele wurden nach der Detektion der Radioaktivität mit Coomassie gefärbt und zeigten in allen Spuren annähernd die gleiche Menge der PDZ-Domäne.

### 3.1.7.2 Phosphorylierungsstellen der Protein Kinase C alpha in PDZ 1 und PDZ 2

Für die Identifikation der Phosphorylierungsstelle wurden die PDZ-Domänen mit der Kinase PKC $\alpha$  umgesetzt und anschließend elektrophoretisch getrennt. Die PDZ-Domänen wurden im Gel mit Proteasen verdaut. Die Massen der entstandenen Peptide plus 80 Da für die eventuell vorhandene Phosphorylierung wurden berechnet. Im Massenspektrometer wurden Peptide selektiert, die den Massen phosphorylierter Peptide aus der PDZ-Domäne entsprachen. Diese Peptide wurden im MS/MS-Modus defragmentiert und aus den Fragmentationen, die Phosphorylierungsstelle bestimmt. Da das Phosphat bei der Defragmentierung des Peptids als Phosphorsäure abgespalten wird, entspricht ein Neutralverlust von 98 Da der Differenz zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid. Für die PDZ 1-Domäne wurde eine Phosphorylierung an Threonin 109 nachgewiesen (Abb. 19 und Abb. 20).



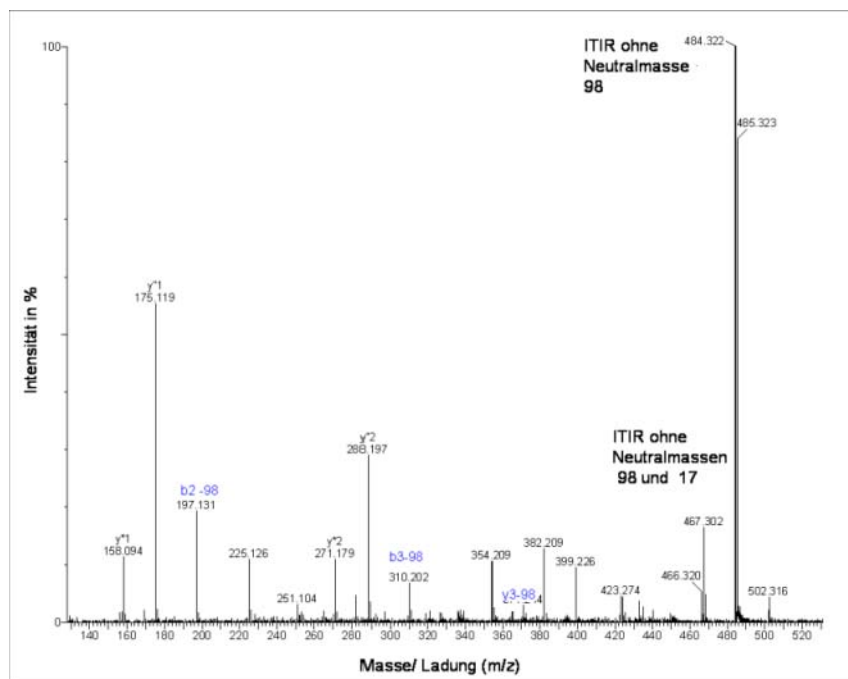
## Ergebnisse



**Abb. 19: Massenspektrum des Phosphopeptids  $I_{(\text{phos})}\text{TIR}$  aus der PDZ 1-Domäne**

Die errechnete Masse für das phosphorylierte mit der Aminosäuresequenz  $I_{(\text{phos})}\text{TIR}$  (phos=Phosphat) beträgt 582,3011 Da.

Durch die Defragmentierung wird das Phosphat (Neutralmasse 80 Da), als Phosphorsäure (Neutralmasse 98 Da), Hydroxydionen (Neutralmasse 17) oder ganze Aminosäuren abgespalten. Massen von Peptiden, bei denen Aminosäuren vom N-Terminus abgespalten wurden, bezeichnet man als b-Fragmente. Wurden Aminosäuren vom C-Terminus abgespalten, werden die entstandenen Fragmente als y-Fragmente bezeichnet.



**Abb. 20: Defragmentierung im MS/MS Spektrum beweist die Phosphorylierung von Thr109 in PDZ 1**

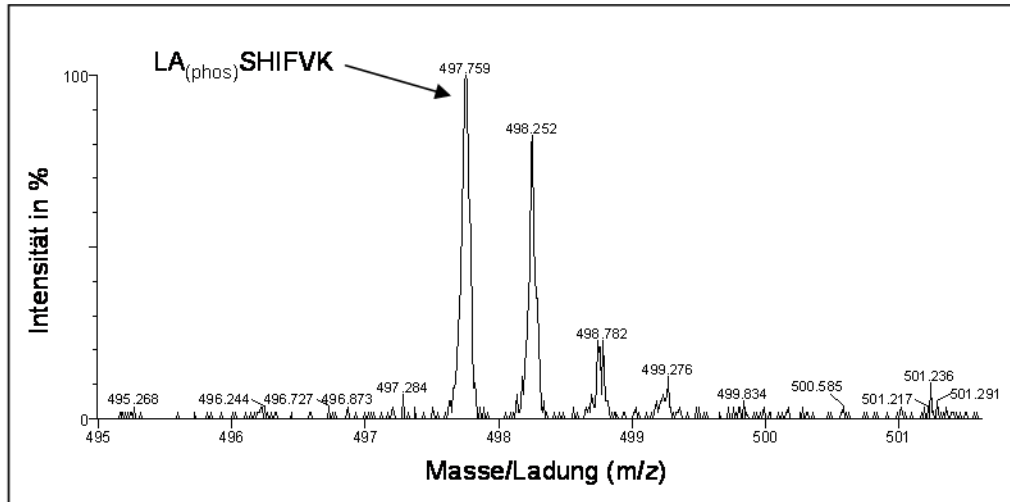
Defragmentierungsspektrum des Peptids mit der Masse 582,3011 Da. Das stärkste Signal bei 484,322 Da zeigt das Peptid mit der Aminosäuresequenz ITIR ohne Phosphorsäure.

In Abb. 20 ist ein MS/MS Spektrum der Fragmentationen dargestellt. Das Signal mit der größten Intensität bei 484,322 entspricht dem Peptid mit der Aminosäuresequenz ITIR ohne Phosphorsäure.

## Ergebnisse

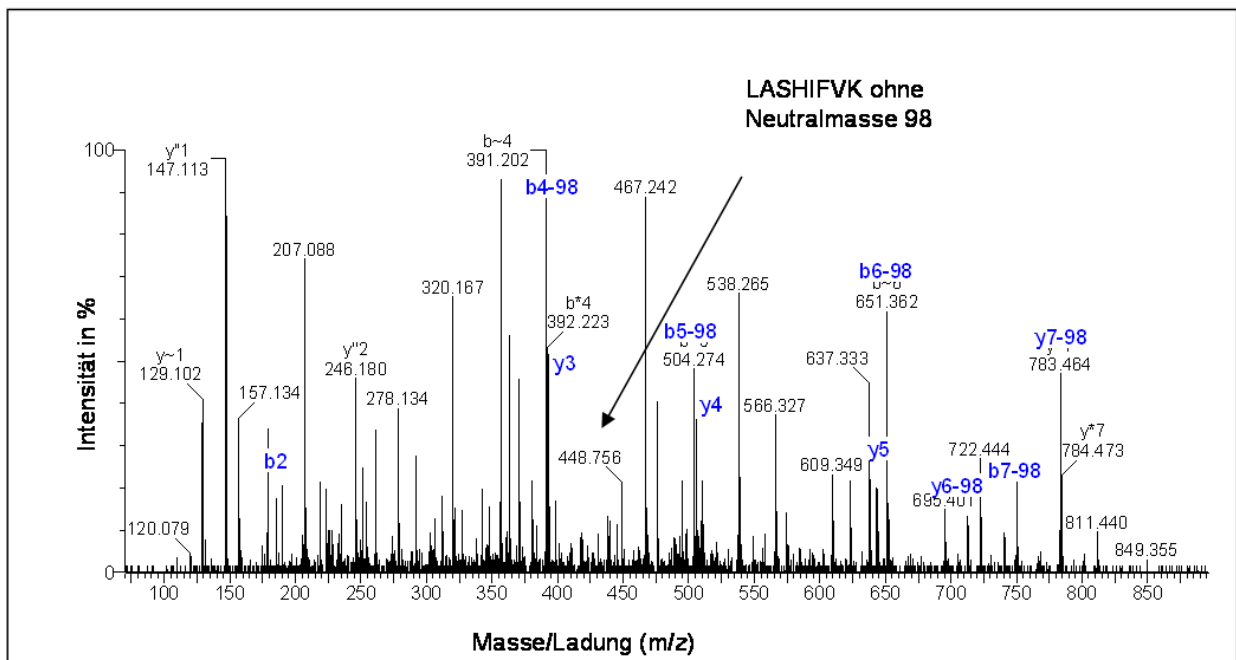
Da es aus dem MS Peak mit einer Masse von 582,3 entstanden ist, gibt der Neutralverlust von 98 die Phosphorylierung an.

Die PDZ 2-Domäne wurde *in vitro* durch die PKC $\alpha$  an Serin 208 phosphoryliert (siehe Abb. 21+ Abb. 22).



**Abb. 21: Massenspektrum des Phosphopeptids LA<sub>(phos)</sub>SHIFVK aus der PDZ 2-Domäne**

Die errechnete Masse für das phosphorylierte Peptid mit der Aminosäuresequenz LA<sub>(phos)</sub>SHIFVK (phos=Phosphat) beträgt 497.7597 Da bei doppelter Ladung.

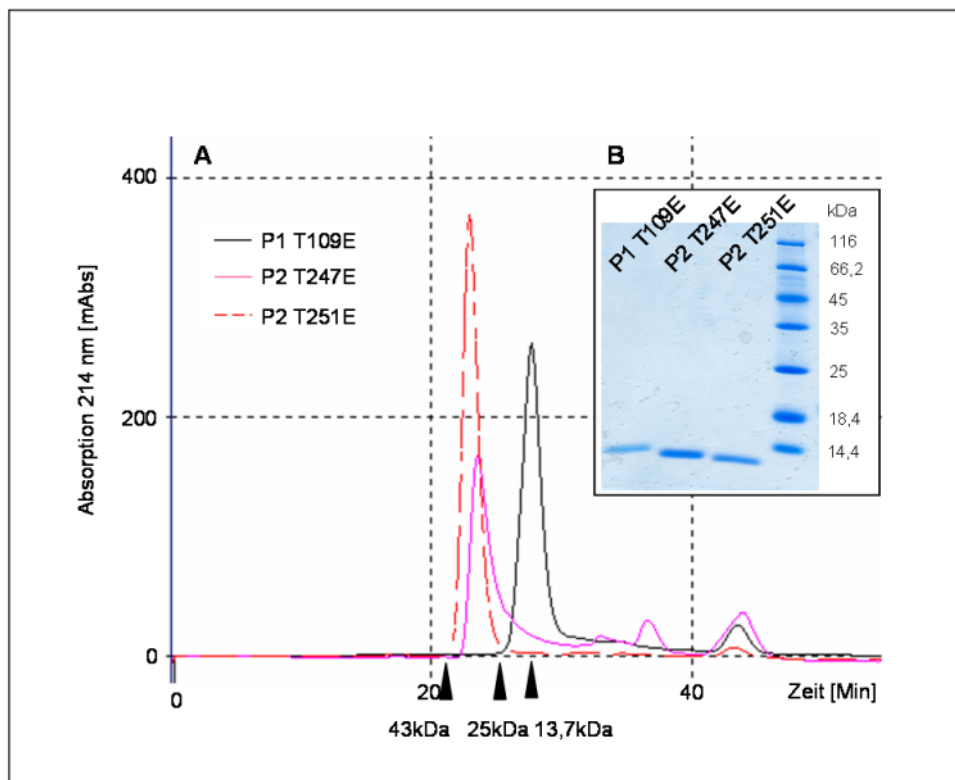


**Abb. 22: MS/MS Spektrum beweist die Phosphorylierung von Ser 208 in PDZ 2**

Ein Peptid mit abgespaltener Neutralmasse von 98, ergibt bei doppelter Ladung einen Neutralverlust von 49 Da, zeigt das unphosphorylierte Peptid mit der Aminosäuresequenz LASHIFVK.

### 3.1.7.3 PDZ-Domänen mit vorgetäuschter Phosphorylierung verhalten sich wie der Wildtyp in der Größenausschlusschromatografie

Mit ortsspezifischer Mutagenese wurden die PDZ1 (P1) und PDZ 2 (P2) Mutanten P1 T109E, P2 T247E, P2 T251E erzeugt. Der Austausch der Aminosäure gegen Glutamat fügt eine negative Ladung in das Protein ein und imitiert so eine ähnliche Größe und Ladung wie die phosphorylierte Aminosäure. Die Retentionszeiten der Mutanten (P1 T109E 27,6 min; P2 T247E 23,5 min; P2 T251E 22,9 min) in der Größenausschlusschromatografie (Abb. 23 A) waren vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 11.) Daraus lässt sich auf eine ähnliche Struktur schließen.



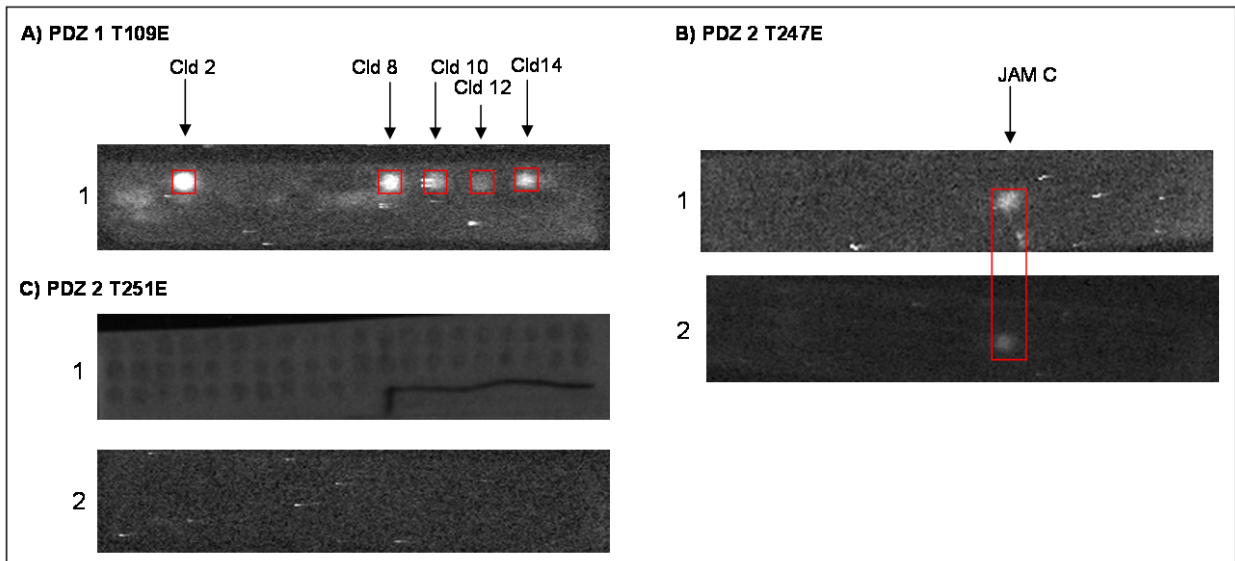
**Abb. 23:** Die PDZ-Domänen mit Mutation verhalten sich in der Größenausschlusschromatografie und dem Polyacrylamidgel wie die PDZ-Domänen.

**A** Chromatogramm der PDZ 1 (P1) und 2 (P2)-Mutanten getrennt auf einer Superdex 75 Säule. Die schwarze Kurve entspricht der P1 T109E Mutante. Die rosa Kurve gehört zur P2 T247E Mutante und die rote Kurve zur Mutante P2 T251E. **B** 15% Polyacrylamidgel der PDZ-Mutanten.

### 3.1.7.4 Bindungseigenschaften von PDZ-Domänen mit vorgetäuschter Phosphorylierung

Die Inkubation der PDZ-Mutanten mit einer Bibliothek aus 51 Peptiden (s. 3.1.4) erbrachte für P1 T109E ein unverändertes Bindungsmuster an die Claudine 2, 8, 10 und 14 im Vergleich zum Wildtyp. Zusätzlich wurde Claudin 12 erkannt (Abb. 24 A). Die Mutation hatte somit keine Auswirkung auf die Bindung an die ausgewählten 51 C-Termini. Die PDZ 2 Mutanten zeigten ein abweichendes Bindungsverhalten gegenüber dem Wildtyp. Der Wildtyp erkannte die C-Termini von Connexin 43 und 35 sowie JAM B und C. Die Mutante P2 T247E band in zwei unabhängigen Versuchen nur an JAM C (Abb. 24 B). Für die Mutante P2 T251E konnte in zwei unabhängigen Versuchen keine Bindung an ein Peptid detektiert werden (Abb. 24 C).

## Ergebnisse



**Abb. 24: Austausch von Threonin gegen Glutamat in den PDZ-Domänen von ZO-1 hat eine Auswirkung auf die Ligandenbindung der PDZ-Domänen**

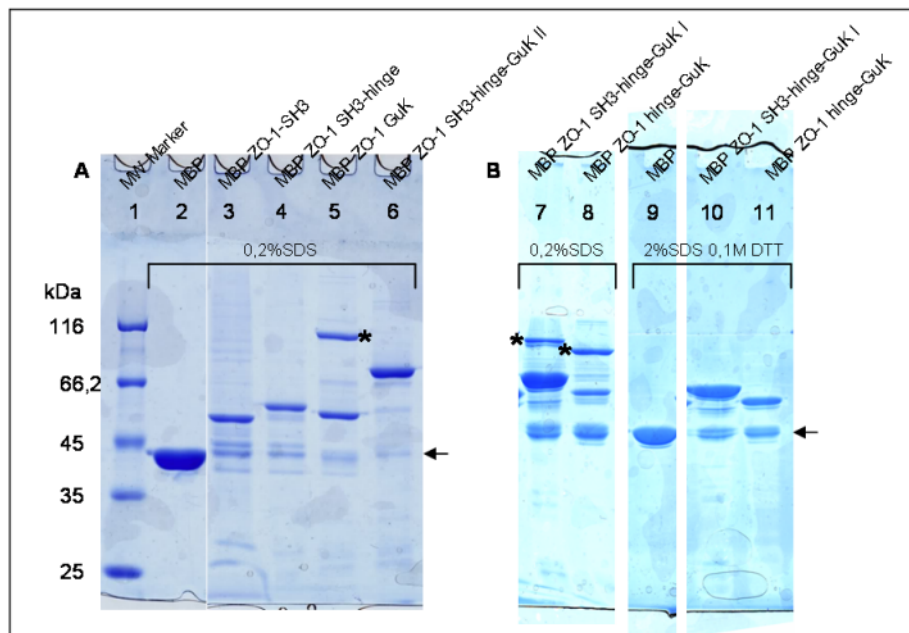
Die PDZ-Mutanten wurden mit Peptidbibliotheken inkubiert. Die PDZ-Domänen wurden mit einem Antikörper nachgewiesen. In den roten Kästen sind weiß die Punkte zu erkennen an denen die PDZ-Domäne an Peptide gebunden hat.

### 3.2 Selbstassoziation der SH3-hinge-GuK-Einheit von ZO-1

Das Homologiemodell von S. Müller et al. zeigt eine Dimerisierung der SH3-hinge-GuK-Einheit von ZO-1 durch Interaktion der GuK-Domänen (Abb. 6). Für die gesamte Einheit wurde eine Selbstinteraktion nachgewiesen. Im Folgenden wurden die Anteile der einzelnen Struktureinheiten der SH3-hinge-GuK-Einheit an der Selbstassoziation charakterisiert.

#### 3.2.1 Darstellung von ZO-1 Deletionsmutanten

Für die Untersuchungen standen verschiedene MBP-Fusionsproteine mit Verkürzungen aus der SH3-hinge-GuK-Einheit von ZO-1 zur Verfügung. Die Reinheit der Proteine wurde im Acrylamidgel (Abb. 25) überprüft. Aus den Abb. 25 A und B ist ersichtlich, dass alle MBP-ZO-1 Fusionsproteine zusätzlich ein Protein mit dem zu erwartenden Molekulargewicht von MBP enthielten (s. Pfeile). Für die MBP-ZO-1 GuK-Domäne sowie MBP-ZO-1 hinge-GuK und MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK I wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Dimerisierung beobachtet (Abb. 25 A Spur 5, B Spuren 7+8 Sterne), die in der MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK II-Einheit (Abb. 25 A Spur 6) nicht auftrat. Die MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK I-Einheit (AS 502-812 / 79 kDa) unterscheidet sich von der MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK II-Einheit (AS 516-806 / 76,6) durch die Verkürzung um 14 Aminosäuren am N-terminalen Ende und sechs Aminosäuren am C-terminalen Ende.

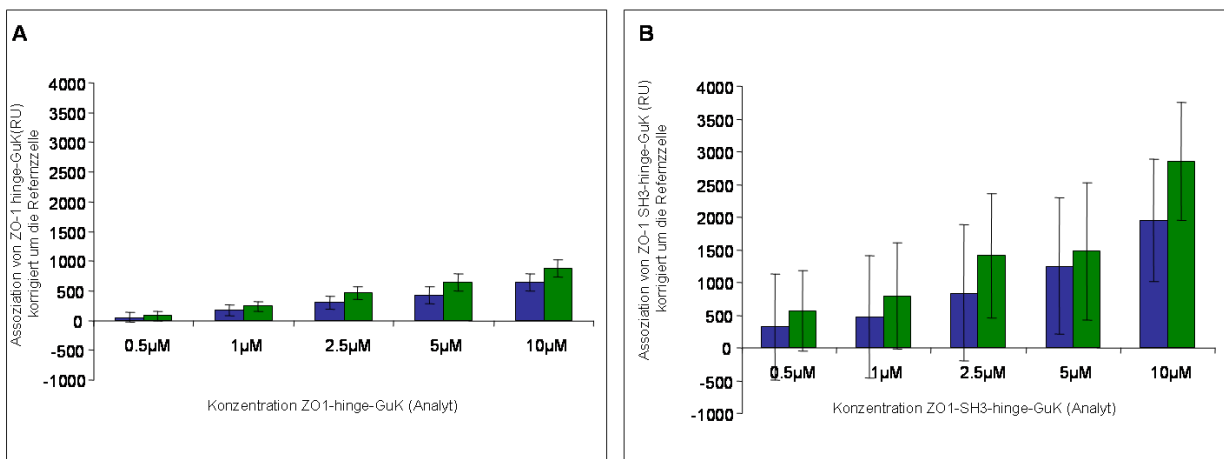


**Abb. 25: Die Domänen der ZO-1 SH3-hinge-GuK-Einheit in der SDS-Gelelektrophorese**

**A** Die MBP-ZO-1 Fusionsproteine wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen mit 0,2% SDS auf einem 10% Polyacrylamidgel getrennt. Zum Vergleich wurde MBP (Spur 2) und ein Molekulargewichtsmarker (Spur 1) mitgeführt. Der Pfeil markiert die Laufhöhe von MBP. Spur 3-6 zeigen die MBP-ZO-1 Fusionsproteine. Für die MBP-ZO-1 GuK-Domäne ist in Spur 5 eine Dimerisierung unter nicht reduzierenden Bedingungen (s. Stern) zu beobachten. **B** 13%ige Polyacrylamidgele mit MBP-ZO-1 Fusionsproteinen, die in der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie zum Einsatz kamen. Unter nichtreduzierenden Bedingungen wurde bei beiden Proteinen eine Dimerbande detektiert (Spur 7+8), die sich durch Zusatz von 0,1M DTT reduzieren ließ (Spur 10+11) in Spur 9 wurde MBP aufgetragen. MBP war auch in allen weiteren Proben enthalten.

### 3.2.2 Die ZO-1 SH3-hinge-GuK-Einheit und Verkürzungen interagieren mit sich selbst in der Oberflächenresonanz Spektroskopie

Im SPR-Experiment wurden MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK und MBP-ZO-1 hinge-GuK als Liganden an die Chipoberfläche immobilisiert und die gleichen Proteine als Analyt superfundiert. Vor jeder Messung wurden die Analyten zentrifugiert und ihre Konzentration mit der Bradford-Methode bestimmt. Bei der Zentrifugation wurde ein Teil der Proteine pelletiert, was auf eine Aggregation der Proteine hinwies. Die stärkste durchschnittliche Assoziation nach 320 Sek. verursachte MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK als Analyt an das immobilisierte MBP-ZO-1-hinge-GuK und an sich selbst. Das MBP-ZO-1 hinge-GuK Protein band besser an sich selbst, als an MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK. Daraus folgt, dass die Messungen hinsichtlich der Verwendung der Proteine als Analyt oder Ligand nicht umkehrbar waren. Eine Erklärung dafür wäre die unterschiedlich starke Selbstassoziation der verwendeten Proteine in Lösung. Da der Oligomerisierungsgrad der Proteine die Masse der Teilchen in Lösung bestimmt, die als direkte Messgröße in die Messung eingeht, wäre eine homogene Verteilung der Oligomere und die Kenntnis der Masse Voraussetzung für die exakte Auswertung der Ergebnisse. Eine weitere unbekannte Größe ist der Anteil der MBP-Verunreinigung an der Gesamtkonzentration der Proteine. Da MBP nicht zur Bindung an den Chip oder den Liganden beitrug, müsste die Konzentration um den Anteil des MBP korrigiert werden.



**Abb. 26: Die ZO-1 SH3-hinge-GuK-Einheit und die ZO-1 hinge-GuK-Einheit zeigen eine konzentrationsabhängige Interaktion im Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Experiment**

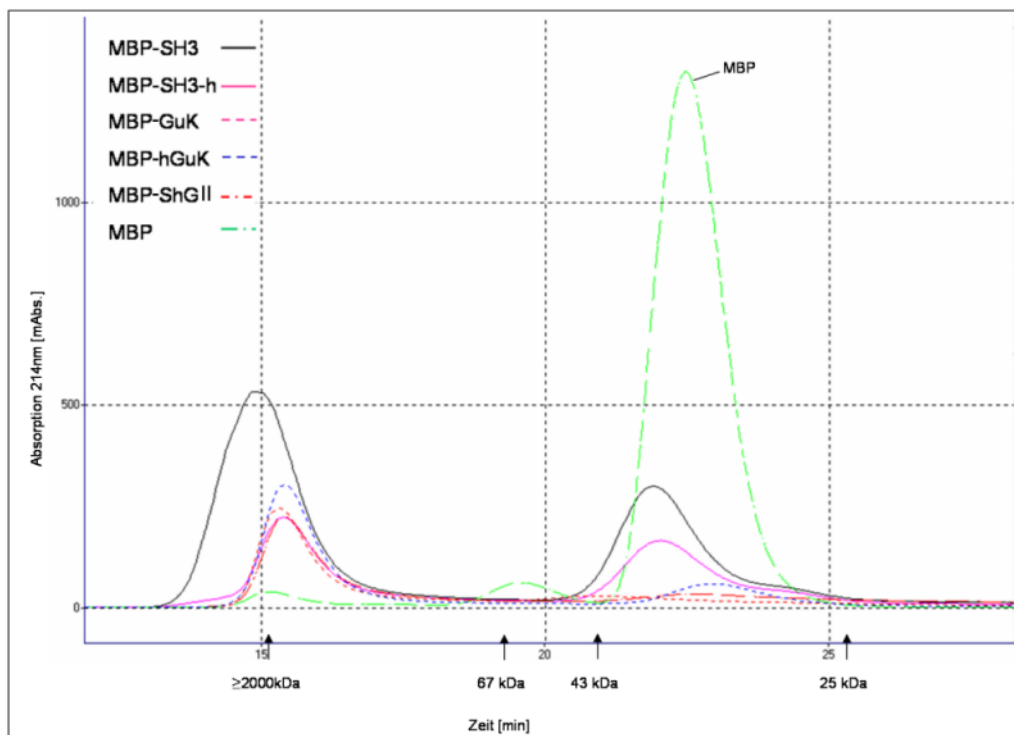
MBP-Fusionsproteine der SH3-hinge-GuK I-Einheit wurden über einen Chip superfundiert der mit denselben Proteinen beschichtet war. In Blau wurden die Messwerte auf der MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK I Flusszelle dargestellt. Die grünen Säulen repräsentieren die MBP-ZO-1 hinge-GuK Flusszelle. Als Referenz wurde die Interaktion mit einer unbeschichteten Flusszelle abgezogen. Von den korrigierten Werten wurde der Mittelwert aus vier Experimenten dargestellt. Die Balken zeigen die Standardabweichung an. Die Werte wurden für die jeweilige Konzentration des Analyten als Änderung der Resonanzeinheiten dargestellt. **A** zeigt die Assoziation von MBP-ZO-1 hinge-GuK als superfundiertes Protein nach 320 Sek. **B** zeigt die Assoziation von MBP-ZO-1 SH3-hinge-GuK I nach 320 Sek.

Die Assoziation des Analyten nach 320 Sekunden schwankte bei allen Konzentrationen sehr stark. Eine Auswertung von kinetischen Daten war nicht möglich. Ein Grund war, dass die Konzentration der Analyten nicht genau bestimmt werden konnte. Dies lag an einer starken Absorption der ZO-1 SH3-hinge-GuK I und hinge-GuK-Einheit bei 260 nm. Eine weitere Unbekannte war die Masse der Analyten

in der Lösung, die von ihrem Oligomerisierungsgrad abhängt. Der Oligomerisierungsgrad wurde in Kapitel 3.2.3 genauer untersucht.

### 3.2.3 Die SH3-*hinge*-GuK-Einheit und ihre einzelnen Domänen zeigen große Oligomere in der Größenausschlusschromatografie

Die Größe der Aggregate unterschiedlicher, in Abb. 25 dargestellter, Abschnitte der SH3-*hinge*-GuK II-Einheit als MBP-Fusionsproteine wurden mittels Größenausschlusschromatografie auf einer Superdex 75 Säule in Kaliumphosphatpuffer pH 6,9, untersucht. Das Ergebnis wurde in Abb. 27 dargestellt. Die unterschiedlichen Domänen waren so stark aggregiert, dass sie von dieser Säule nicht getrennt wurden. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die MBP-Fusionsproteine der SH3, SH3-*hinge* und *hinge*-GuK-Domänen MBP enthielten.



**Abb. 27: Die Chromatogramme der ZO-1 SH3-*hinge*-GuK II-Einheit und ihrer Verkürzungen zeigen Oligomere**

MBP-Fusionsproteine der SH3-*hinge*-GuK (ShG/ 76,6 kDa)-Einheit und Verkürzungen daraus wurden auf einer Superdex 75 Säule getrennt. Sie lagen alle außerhalb des Trennbereichs der Säule vor. MBP-SH3 (54 kDa), MBP-SH3-*hinge* (SH3-h/ 58,8 kDa) und MBP-*hinge*-GuK (h-GuK/ 64 kDa) zeigten eine Verunreinigung mit MBP (42 kDa). MBP wurde zum Vergleich appliziert und eluierte nach 22,5 Min. Der Pfeil bei 15,1 Minuten markiert die Retentionszeit von Dextran 2000 (2000 kDa), welches das Ausschlussvolumen der Säule angibt. Weitere Pfeile in der Zeitachse zeigen die Retentionszeiten der Markerproteine Rinderserumalbumin 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa und Chymotrypsinogen A 25,3 kDa an.

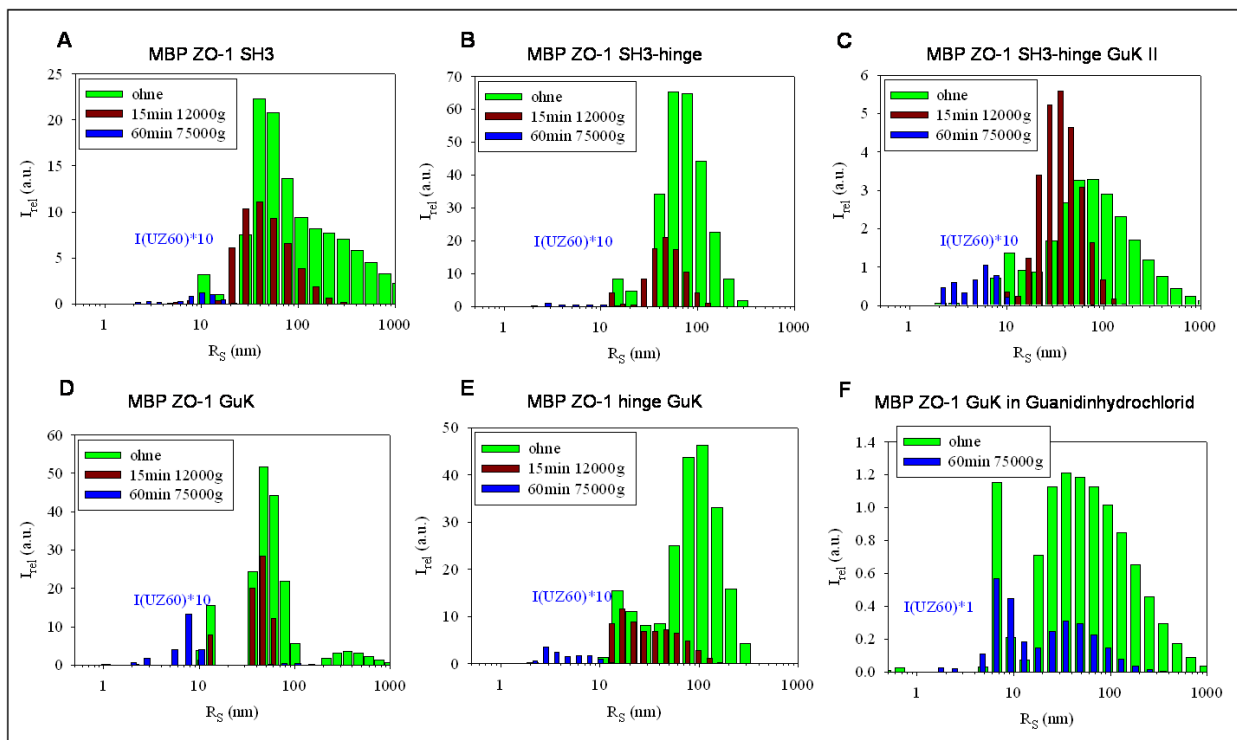
### 3.2.4 Dynamische Lichtstreuung an ZO-1 SH3-*hinge*-GuK Deletionsmutanten bestätigen die Oligomerisierung

Um die Größe der Oligomere in Lösung zu erfassen, wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Dazu wurden die MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK II-Einheit und ihre Verkürzungen in Phosphatpuffer pH 6,9 und 5 mM Maltose vermessen. Vor der Messung wurden die Proben entgast. Die Proteine wurden 15 Minuten bei 12000 xg zentrifugiert und nach einer weiteren Messung nochmals bei



## Ergebnisse

75000 xg für eine Stunde (h) zentrifugiert. In beiden Zentrifugationsschritten ließen sich Proteine aus der Lösung entfernen, was auf große Proteinkomplexe hindeutete. Die unzentrifugierten Proben (Abb. 28, A-E grüne Balken) zeigten die größten Aggregate mit Radien weit über 100 nm. Die Aggregate mit der maximalen Streuintensität lagen bei allen MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK Verkürzungen zwischen 50 und 100 nm. Die Zentrifugation bei 12000 xg bewirkte eine Abnahme der großen Aggregate über 100 nm (Abb. 28. A-E, rote Balken). Nach Ultrazentrifugation bei 75000 xg wurden vermehrt Proteinkomplexe mit Radien von 10 nm und weniger detektiert. Um die Messwerte im gleichen Diagramm darstellbar zu machen, wurden sie mit dem Faktor 10 multipliziert (Abb. 28 A-E, blaue Balken). Durch die Zentrifugation wurden Proteine aus der Probe entfernt. Die niedrigeren Streuintensitäten nach der Zentrifugation erklären sich aus der geringeren Konzentration der Probe.



**Abb. 28: Lichtstreuungsuntersuchungen zeigen, die MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK II Einheit und ihre Verkürzungen bilden Oligomere**

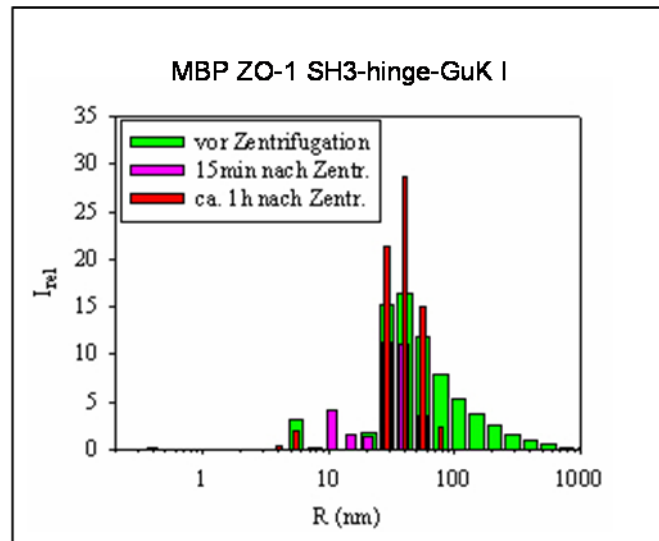
Dargestellt sind die Radienverteilungen ( $R_s$ ) der einzelnen Proteine in (nm) aufgetragen gegen ihre Streuintensität ( $I_{rel}$  in arbitrary units/ willkürlichen Einheiten). A bis F stellen die Daten für MBP-ZO-1 SH3 (A), MBP-ZO-1 SH3-*hinge* (B), MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK (C), MBP-ZO-1 GuK (D) und MBP-ZO-1 *hinge*-GuK (E) dar. In F wurde eine Messung der MBP-ZO-1 GuK nach Dialyse gegen 5,8 M Guanidiniumhydrochlorid aufgetragen. Die blauen Balken die Streuintensitäten der ZO-1 Proben nach 60 min Zentrifugation bei 75000 xg wurden um den Faktor von 10 gestreckt.

Eine Auswertung der Masse der streuenden Teilchen war nicht möglich, da die Konzentration der Probe nicht genau bestimmt werden konnte. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine UV-Spektrum aufgenommen. Die Proben zeigten eine starke Absorption bei 260 nm, die auf eine Verunreinigung mit Nukleinsäuren hindeutete. Um die Absorption bei 260 nm zu verringern, wurden während der Reinigung der Proteine Nukleasen zugesetzt. Der Einsatz von Nukleasen verringerte die Absorption bei 260 nm nicht. Eine Abschätzung der Protein- und DNA-Konzentration erbrachte, dass die Bindung von vier Nukleotiden pro Protein für die Absorption bei 260 nm ausreichend wäre. Die GuK-Domäne zeigte die stärkste Absorption bei 260 nm. Eine Dialyse der GuK-Domäne in 5,8 M



## Ergebnisse

Guanidiniumhydrochlorid sollte die Domäne entfalten. Sollten Nukleotide innerhalb der Domäne gebunden sein, sollten diese durch Dialyse entfernt werden. Die Dialyse in 5,8 M Guanidiniumhydrochlorid führte weder zu einer Entfaltung der Aggregate (Abb. 28 F) noch zu einer Verringerung der Absorption bei 260 nm.



**Abb. 29: Zeitabhängige Bildung der MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK I Oligomere in der Lichtstreuung**

Die MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK I-Einheit zeigt als unzentrifugierte, entgaste Probe eine Verteilung der Radien mit einem Maximum bei ungefähr 50 nm (grüne Balken). Durch Zentrifugation bei 12000 xg für 15 Minuten ließen sich die größten Aggregate aus der Lösung entfernen (violette Balken). Nach einer Stunde (rote Balken) stellte sich die Verteilung mit einem Maximum bei ca. 50 nm wieder ein.  $I_{rel}$  = relative Intensität des Streusignals in willkürlichen Einheiten R = hydrodynamische Radius

Für MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK I wurde zusätzlich der Verlauf der Aggregation über eine Stunde beobachtet. Die Oligomere in der unzentrifugierten entgasten Proteinlösung zeigte einen durchschnittlichen Radius von 50 nm (Abb. 29 grüne Balken). Nach der ersten Messung wurde die Probe bei 12000 xg 15 Minuten zentrifugiert. Die zentrifugierte MBP-ZO-1 SH3-*hinge*-GuK-Einheit I zeigte nach 15 Minuten eine weitere Population bei 10 nm (Abb. 29 violette Balken). Nach einer Stunde näherte sich die Größe der Oligomere wieder dem Radius von 40 nm an (Abb. 29 rote Balken) und die Population bei 10 nm verschwand.

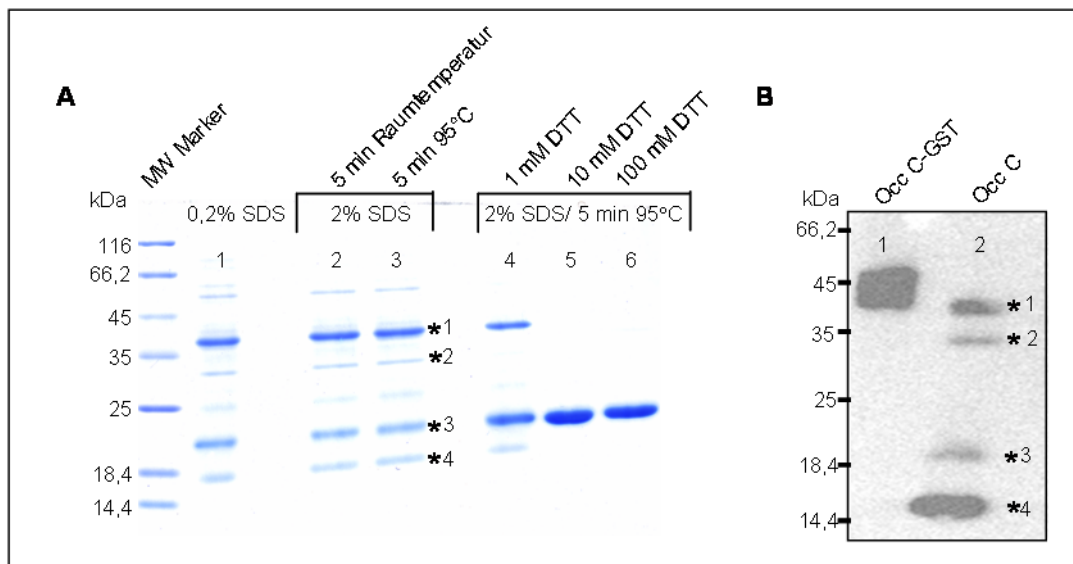
### 3.3 Die C-terminale *coiled-coil*-Domäne von Occludin interagiert mit sich selbst

Die Interaktionsdomäne am C-Terminus von Occludin (Occ C) besteht aus einer *coiled-coil* Struktur, die über elektrostatische Wechselwirkungen mit sich selbst in einem Vierhelixbündel interagiert (Muller et al. 2005). In dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die die Vorstellungen zur Dimerisierung vom C-Terminus Occludin aus dem Model erweitern.

Occ C wurde als rekombinantes Protein mit drei verschiedenen Affinitätsanhängen in *E. coli* exprimiert. Nach der Reinigung mittels Affinitätschromatografie wurden die Anhänge durch Proteasespaltung entfernt. Die größte Ausbeute ließ sich aus der Expression und Reinigung von Occ C mit GST-Anhang erzielen. Das GST wurde durch Thrombin abgespalten. Daneben stand der Occ C mit Maltosebindeprotein (MBP) als Fusionspartner zur Verfügung. MBP war durch Faktor Xa abspaltbar. Zusätzlich war der Occ C als Fusion mit N-terminalem sechsfach Histidin-Anhang verfügbar. Wenn nicht anders angegeben, wurde im Folgenden Occ C aus dem GST/Thrombin System verwendet.

#### 3.3.1 Identifizierung von Oligomeren der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin mit SDS-Gelelektrophorese und *Immuno-Blotting*

Occ C wurde unter Zusatz verschiedener SDS- und DTT-Konzentrationen auf einem 13%igen PAA-Gel getrennt (Abb. 30 A). Dabei stellte sich Occ C unabhängig von der Konzentration des Detergens als Mischung aus mehreren Banden dar (Abb. 30 A Spuren 1-3). Erhitzen des Occ C in 2% SDS konnte die Bandenzahl nicht verringern (Abb. 30 A Spur 3).



**Abb. 30: Nachweis der Oligomerisierung der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin mit SDS-Gelelektrophorese (A) und mit *Immuno-Blot* (B)**

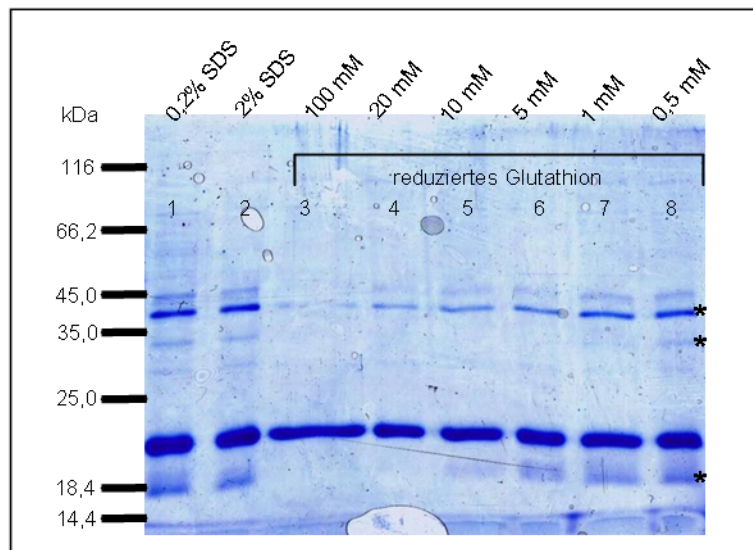
**(A)** 5 µg Occ C wurden mit verschiedenen Detergens- und DTT-Konzentrationen versetzt und mit SDS-PAGE auf einem 13% PAA-Gel getrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. **(B)** *Immuno-Blot* von Occ C-GST (Spur 1) aus einem *E. coli* Zelllysat und 1 µg gereinigtem Occ C. Die Proteine wurden mit einem Antikörper gegen Occ C detektiert. Auf der linken Seite wurde die Lage der Proteine aus dem MW-Marker aufgetragen. Die Sterne kennzeichnen die reproduzierbar auftretenden Banden des Occ C

## Ergebnisse

Die Zugabe des Reduktionsmittels DTT führte zu einer Abnahme der Proteinbanden (Abb. 30 A Spur 4-6). Die resultierende Proteinbande hatte ein anscheinendes Molekulargewicht von 20 kDa. Das errechnete Molekulargewicht von Occ C beträgt 14 kDa und weicht somit vom apparenten Molekulargewicht des Proteins ab. Im *Immuno-Blot* mit einem Antikörper gegen Occ C wurden vier Banden zwischen 40 und 15 kDa detektiert (Abb. 30 B Spur 2). Als Kontrolle wurde das Occ C GST Fusionsprotein im *E. coli* Zelllysat nachgewiesen. Die Proteine wurden mit 2% SDS ohne Reduktionsmittel auf einem 13% PAA-Gel getrennt. Die detektierte breite Bande bei 45 kDa entsprach dem berechneten Molekulargewicht von Occ C GST von 43 kDa (Abb. 30 B Spur 1). In dieser Probe wurden keine weiteren Banden mit kleinerem Molekulargewicht detektiert. Alle Banden in der Fraktion 2 gehen somit auf den 14 kDa großen Occ C zurück. Die Occ C Banden sind abhängig von der Konzentration des Reduktionsmittels, was auf eine Interaktion über Disulfidbrücken schließen lässt.

### 3.3.2 Abhängigkeit der Oligomerisierung der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin von der Konzentration eines Reduktionsmittels

Um die Selbstinteraktion von Occ C in Gegenwart des zellulären Reduktionsmittels Glutathion darzustellen, wurde die Proteinlösung mit 0,5 bis 100 mM reduziertem Glutathion versetzt und in einem 13% PAA-Gel mit SDS-PAGE getrennt (Abb. 31).



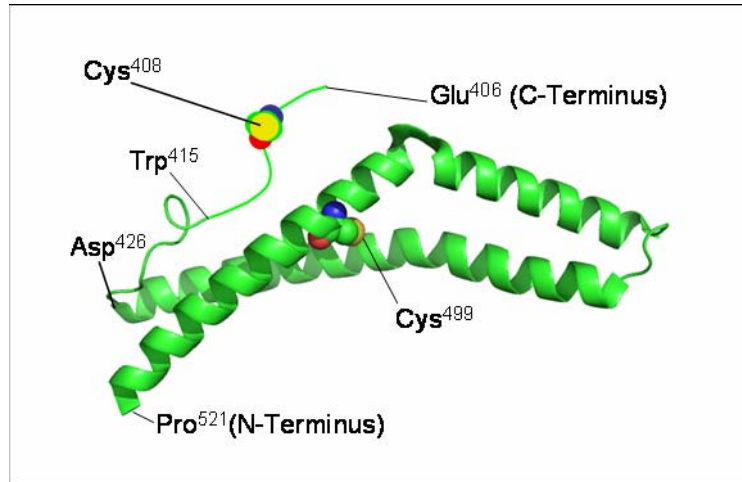
**Abb. 31: Redox Titration der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin**

Occ C wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von SDS und reduziertem Glutathion auf einem 13%igen PAA-Gel getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. (1) Occ C mit 0,2% SDS (2) Occ C mit 2% SDS, (3) bis (8) Occ C mit 0,2% SDS und reduziertem Glutathion (100 mM-0,5 mM), links ist die Laufstrecke der Proteine des MW-Marker gekennzeichnet. Die mit Sternen markieren Banden repräsentieren Zustände des Occ C, die redoxsensitiv reagierten.

Es ist zu erkennen, dass sich die Banden bei 45, 40 und 15 kDa (siehe Sterne in Abb. 31) durch steigende Glutathionkonzentrationen auf eine Bande mit 20 kDa reduzierten. Das Ergebnis zeigt, dass die Selbstinteraktion des Occ C von der Konzentration des Reduktionsmittels abhängig ist. Die Konzentration von SDS im Bereich zwischen 0,2 und 2% hat keinen Einfluss auf die Occ C-Oligomere. Dieses Verhalten lässt sich durch eine Oligomerisierung über Disulfidbrücken erklären.

### 3.3.3 Chemische Modifizierung der Cysteine in der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin

Der Occ C enthält in der Sequenz von Aminosäure 406 bis 521 zwei Cysteine an den Positionen 408 und 499 (Abb. 32).



**Abb. 32: Position der Cysteine in der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin**

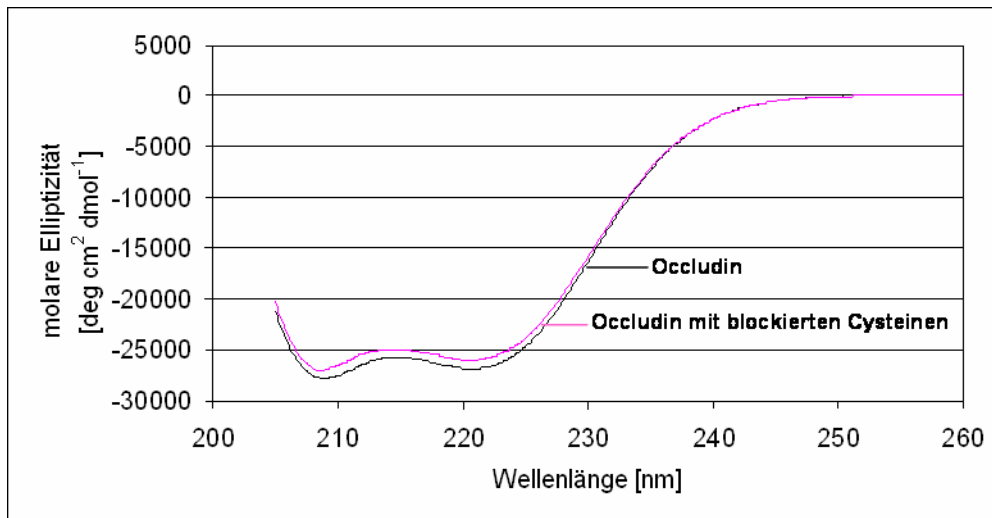
Die Darstellung beruht auf der Kristallstruktur von humanem Occludin<sup>413-522</sup> (Li et al. 2005). Der C-Terminus von Occludin zeigt eine weitgehend  $\alpha$ -helikale Struktur, die bei Asparaginsäure<sup>426</sup> in eine Schleife übergeht. Die Struktur von humanem Occludin<sup>383-522</sup> zeigte, dass der N-Terminus der Deletionsmutante ab Tryptophan<sup>415</sup> in einen ungeordneten Bereich übergeht. In diesem befindet sich das Cystein<sup>408</sup>.

Die Interaktion über Disulfidbrücken schließt eine Assoziation über elektrostatische Wechselwirkungen nicht aus. Durch kovalente Modifizierung der Cysteine mit 4-Vinylpyridin wurde die Dimerisierung über Disulfidbrücken verhindert. Die Blockierung der Cysteine verlief vollständig. Im Massenspektrum wurde ausschließlich das blockierte Protein mit  $14836 \pm 7$  Da detektiert. Occ C wurde bei einer Masse von  $14622 \pm 7$  Da gemessen. Die Spektren sind im Anhang beigefügt. Mithilfe des blockierten Occ C wurde im Folgenden die Selbstassoziation über elektrostatische Wechselwirkungen getestet.

### 3.3.4 Die C-terminale *coiled-coil*-Domäne von Occludin zeigt eine $\alpha$ -helikale Struktur in der Circular dichroismus-Spektroskopie

Der Occ C wurde im CD Spektrometer auf seine Sekundärstrukturmerkmale untersucht. Dabei wurde eine  $\alpha$ -helikale Struktur (Abb. 33 blaue Kurve) detektiert. Charakteristisch für ein  $\alpha$ -helikales Protein sind ein Maximum der molaren Elliptizität bei einer Wellenlänge von 190 nm sowie zwei Minima bei 208 und 222 nm. Der Gehalt an  $\alpha$ -Helices lässt sich aus der Ausprägung des Minimums bei der Wellenlänge von 222 nm bestimmen.

## Ergebnisse



**Abb. 33: CD-Spektrum der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin mit und ohne blockierte Cysteine**

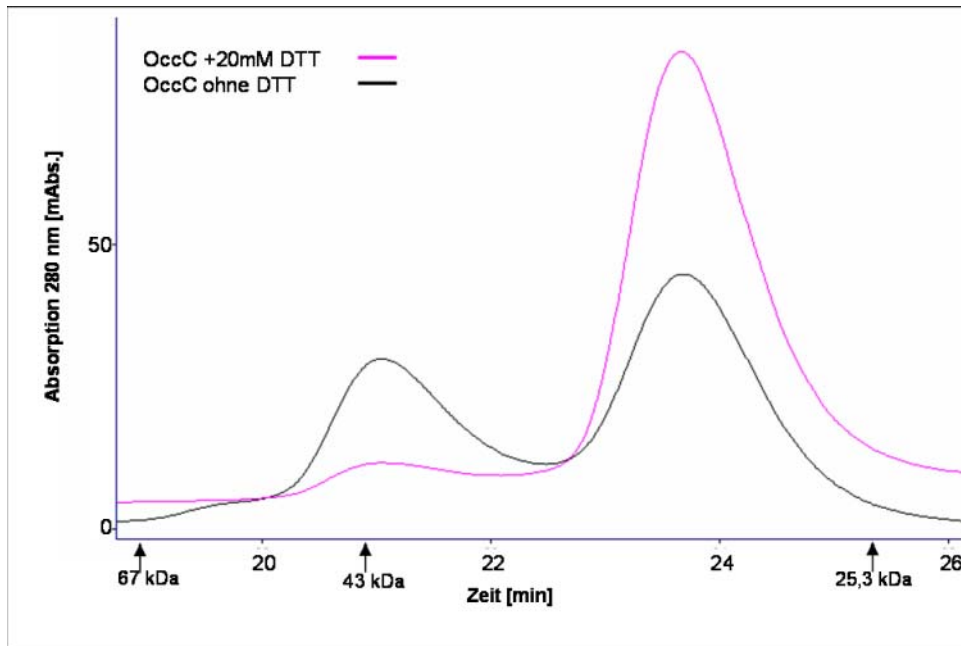
27,5  $\mu\text{M}$  Occ C und 29  $\mu\text{M}$  Occ C mit blockierten Cysteinen wurden mit dem CD-Spektrometer vermessen; an der Abszisse wurde die Wellenlänge  $[\text{nm}]$ , an der Ordinate die molare Elliptizität  $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$  aufgetragen

Ein Vergleich von Occ C mit blockiertem Occ C zeigte, dass die chemische Modifizierung der Cysteine keine Auswirkung auf die Sekundärstruktur des Proteins hatte (Abb. 33). Eine Sekundärstrukturänderung wirkt sich bei einer Entfaltung des Proteins im Nah-UV-Bereich (250 bis 300 nm) durch eine Schwächung der Absorption der Aromaten aus. Dies führte zu einem langsameren Anstieg der Kurve im Bereich ab 230 nm. Bei Beeinträchtigung der  $\alpha$ -Helizität würde sich die Ausprägung der Minima im Fern-UV-Bereich abschwächen. Der Anteil der  $\alpha$ -Helices wurde nach der Methode von Chen berechnet (Chen et al. 1972). Er betrug bei Occ C 80% im Vergleich zu 77% beim Occ C mit blockierten Cysteinen. Daraus lässt sich ableiten, dass durch die Blockierung der Cysteine keine Sekundärstrukturänderung eintrat.

### **3.3.5 Die Selbstinteraktion der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin ist abhängig vom Redoxzustand der Cysteine: Analyse mit Größenausschlusschromatografie**

Die Selbstinteraktion über elektrostatische Wechselwirkungen ist Detergens sensitiv und deshalb neben der kovalenten Wechselwirkung im SDS-PAGE schwer zu detektieren. Die Größenausschlusschromatografie bietet die Möglichkeit, den Occ C in einer flüssigen Phase mit physiologischer Salzkonzentration auf seinen Oligomerisierungsgrad zu prüfen. In TBS-Puffer zeigten sich für den Occ C zwei molekulare Populationen mit Retentionszeiten von 23,7 Minuten sowie 21 Minuten (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** schwarze Linie). Zur Reduktion von Oligomeren, die aufgrund von Disulfidbrücken gebildet wurden, wurde dem TBS-Puffer 20 mM DTT zugesetzt. Der Occ C wurde in derselben Konzentration unter Zugabe von 20 mM DTT auf die Säule geladen. Dies führte zu einer Zunahme des Maximums bei 23,7 Minuten während das Maximum bei 21 Minuten mit dem größeren hydrodynamischen Radius abnahm (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** rosa Linie).

## Ergebnisse

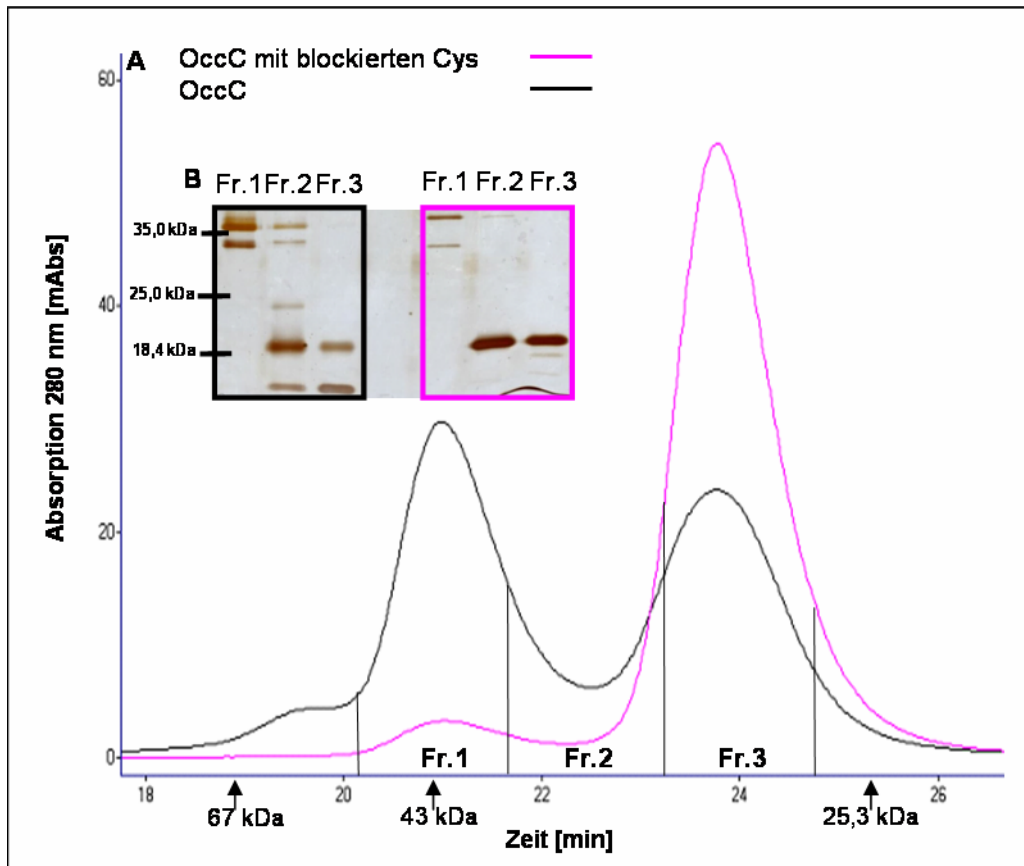


**Abb. 34: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen**

Größenausschlusschromatografie von Occ C in TBS-Puffer (schwarz) und mit 20 mM DTT reduziertem Occ C (violett). Es wurde die Absorption [mAbs] bei 280 nm abhängig von der Zeit [min] aufgetragen. Durch Pfeile in der Zeitachse wurde die Retention der Markerproteine Rinderserumalbumin 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa und Chymotrypsinogen A 25,3 kDa dargestellt.

In einem weiteren Versuch wurde der Occ C mit blockierten Cysteinen mit Occ C verglichen. Der cysteinblockierte Occ C (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** A rosa Linie) zeigte, wie der Occ C unter reduzierenden Bedingungen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** rosa Kurve), eine Retentionszeit von 23,7 Min. Der Occ C eluierte in zwei Populationen mit Retenzionszeiten bei 21 und 23,7 min. Die Fraktionen unter den Occludinmaxima aus dem Chromatogramm von **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** wurden gesammelt und auf einem 13% PAA-Gel getrennt. Die Proteine wurden mit Silbernitrat gefärbt. (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** B). Die Fraktionen enthielten Proteinbanden mit einer Verteilung wie im PAA-Gel aus Abb. 30. Die zwei Banden mit dem höheren Molekulargewicht bei ca. 40 und 30 kDa waren in der Fraktion eins enthalten. Die zwei Banden mit dem Molekulargewicht von 20 und 15 kDa fanden sich in Fraktion drei. Bei Occ C mit den blockierten Cysteinen war eine Hauptbande bei 20 kDa in Fraktion zwei und drei dominierend. Das kleine Maximum in der Fraktion eins enthielt zwei Banden bei 40 und 30 kDa.

## Ergebnisse



**Abb. 35: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin mit und ohne blockierte Cysteine**

**A:** Die schwarze Kurve entspricht dem unveränderten Occ C, die rosa Kurve dem Occ C mit blockierten Cysteinen. Es wurde die Absorption [mAbs] bei 280 nm abhängig von der Zeit [min] aufgetragen. Zusätzlich sind die Fraktionen (Fr.1-Fr.3), die gesammelt und auf ein PAA-Gel geladen wurden, dargestellt. Durch Pfeile in der Zeitachse wurde die Retention der Markerproteine Rinderserumalbumin 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa und Chymotrypsinogen A 25,3 kDa dargestellt.

**B:** Die Fraktionen 1-3 aufgetrennt auf einem 13% PAA-Gel. Die Proteine wurden mit Silbernitrat gefärbt. Spur 1-3: Fraktionen von Occ C Spur 5-7: Fraktionen des blockierten Occ C in 0,2% SDS. An der linken Seite sind die Molekulargewichte des Proteinmarkers gekennzeichnet.

### 3.3.6 Occludin Monomer und Dimer zeigen eine elongierte Molekülform in der Lichtstreuung

Um das Molekulargewicht der Occ C Moleküle in Lösung zu messen und daraus den Grad der Oligomerisierung zu berechnen, wurde dynamische und statische Lichtstreuung angewandt. Die dynamische Lichtstreuung gibt Aufschluss über den Diffusionskoeffizienten der Moleküle. Bei gleichzeitiger Kenntnis des Molekulargewichtes, welches aus der statischen Lichtstreuung berechnet werden kann, können Aussagen über die Form der Moleküle getroffen werden. Das Ergebnis gibt den Mittelwert der Messgröße für alle Teilchen in der Lösung an. Verglichen wurden Occ C und blockiertes Occ C. Die Ergebnisse sind Tab. 30 zu entnehmen. Das cysteinblockierte Occ C wies in der statischen Lichtstreuung ein Molekulargewicht von  $14200 \pm 1500$  Da auf. Dies entspricht dem Molekulargewicht des Monomers. Das Molekulargewicht der Occ C Probe wurde auf  $22600 \pm 3000$  Da bestimmt. Das Molekulargewicht liegt zwischen dem Molekulargewicht des Monomers und des Dimers. Das erhöhte Molekulargewicht bedeutet, dass in der Lösung Oligomere des Occ C vorhanden waren. Die hydrodynamischen Radien betragen  $2,91 \pm 0,03$  nm für den Occ C und  $2,49 \pm 0,03$  nm für



## Ergebnisse

Occ C mit blockierten Cysteinen. Die SEC-Experimente und SDS PAGE lieferten Hinweise auf das Vorliegen von mehreren Molekülpopulationen des Occ C unter nicht reduzierenden Bedingungen. Nach der Analyse mit statischer Lichtstreuung ist davon auszugehen, dass es sich dabei um Monomere und Dimere handelt. Die hydrodynamischen Radien von Occ C und Occ C mit blockierten Cysteinen weichen vom hydrodynamischen Radius einer kompakten Kugel ab. Bei globulären Proteinen mit einem Molekulargewicht von 14000 kDa wäre ein hydrodynamischer Radius von 1,92 nm zu erwarten (Gast.K und Modler A.J. 2005; Uversky 1993). Die Abweichung ist durch die stäbchenförmige Struktur des Occ C, gut zu erklären. Mit der Abweichung im hydrodynamischen Radius, lässt sich die Verschiebung der Elutionszeiten zu scheinbar höheren Molekulargewichten, beim Vergleich mit den globulären Markerproteinen in der Größenausschlusschromatografie begründen.

**Tab. 30: Die C-terminale *coiled-coil*-Domäne von Occludin mit blockierten Cysteinen zeigt einen kleineren hydrodynamischen Radius in der Lichtstreuung als die unblockierte Domäne**

Untersucht wurden Occ C und Occ C mit blockierten Cysteinen in der dynamischen und statischen Lichtstreuung. Die ermittelten hydrodynamischen Radien unterschieden sich zwischen den Occ C Populationen und wichen von dem berechneten hydrodynamischen Radius für ein globuläres Protein ab. Bei Occ C liegt das apparente Molekulargewicht ( $M_{app}$ ) zwischen dem Molekulargewicht des Monomers und Dimers. Beim blockierten Occ C entspricht das gemessene Molekulargewicht dem erwarteten Molekulargewicht ( $M_{erw}$ ) eines Monomers.

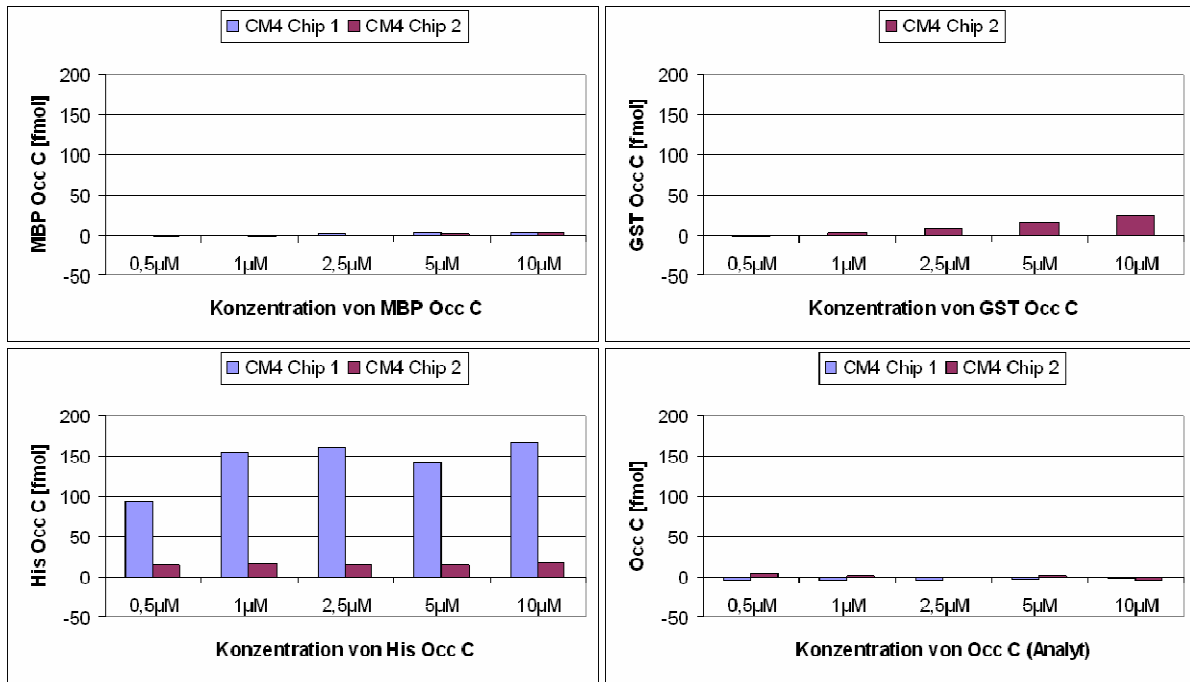
	$M_{app}$ [g/mol]	$M_{erw}$ [g/mol]	hydrodynamischer-Radius [nm] gemessen ( $S_m$ )	hydrodynamischer-Radius [nm] globulär, berechnet ( $S_b$ )	Quotient $S_m/S_b$
Occ C (1,2 mg/ml)	22600±3000	Monomer: 14628,1 Dimer: 29256,2	2,91±0,03	2,27	1,28
Occ C blockiert (0,75 mg/ml)	14200±1500	Monomer: 14838,8	2,49±0,03	1,92	1,29

### 3.3.7 Die Selbstinteraktion der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin wurde mit Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)-Untersuchungen bestätigt

Im SPR-Experiment wurde die Selbstassoziation von MBP Occ C, als immobilisierter Bindungspartner, an Occ C mit verschiedenen Fusionen gezeigt. Mit diesem Experiment sollte die Selbstassoziation von Occ C in Abhängigkeit vom Fusionspartner ermittelt werden. Es wurde gezeigt, dass Occ C mit His-tag und das GST-Occ C Fusionsprotein an immobilisiertes MBP-Occ C Fusionsprotein banden (Abb. 36). Eine Interaktion von GST mit dem Chip konnte experimentell ausgeschlossen werden (persönliche Information von Dr. L.Winkler). MBP-Occ C und der Occ C ohne tag zeigten keine Interaktion mit MBP-Occ C. MBP allein band weder an sich selbst (Daten nicht gezeigt) noch an Occ C (Abb. 36). Für die Auswertung wurden der Mittelwert der RU-Änderung von zwei Messungen nach 320 s Assoziationszeit gebildet und auf die Menge des gebundenen Analyten umgerechnet. Dafür gilt die Beziehung: eine Änderung des Messwerts um 1000 RU entspricht 1 ng gebundenem Analyt. Die Daten berücksichtigen damit die unterschiedlichen Molekulargewichte der Analyten.



## Ergebnisse



**Abb. 36: Selbstinteraktion der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin in Abhängigkeit von verschiedenen Affinitätsanhängen im SPR-Experiment**

MBP-Occ C, GST Occ C, His Occ C, und Occ C wurden über eine MBP-Occ C beschichtete Flusszelle geleitet. Auf der Abszisse ist der Mittelwert der Assoziation nach 320 s abzüglich der Assoziation an die MBP Referenzzelle aufgetragen. Die Assoziation wurde für alle fünf gemessenen Konzentrationen dargestellt. Die Messung erfolgte in Duplikaten auf zwei CM4 Chips.

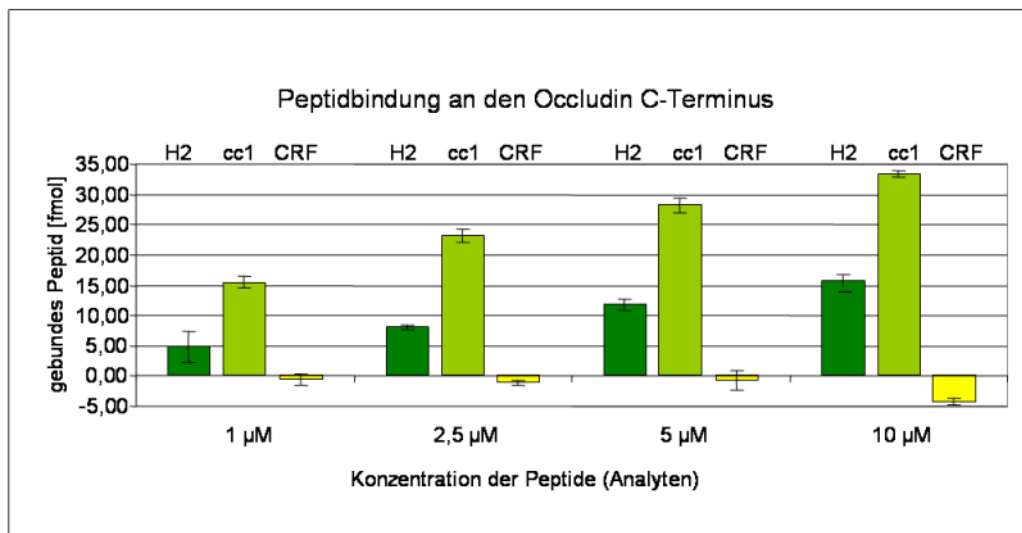
In Abb. 36 ist zu erkennen, dass die Messwerte auf den beiden Chips für einen beliebigen Analyten deutlich voneinander abweichen. Die Abweichung war stärker als die Unterschiede in der Beschichtung der Liganden auf den beiden Chips. Auf dem CM4 Chip 1 wurden 13 fmol MBP auf der Referenzzelle und 53 fmol MBP-Occ C immobilisiert. Auf dem CM4 Chip 2 wurden 17 fmol MBP und 140 fmol MBP-Occ C immobilisiert, was eine Abweichung in der Assoziation zwischen Chip eins und zwei um den Faktor drei erklären würde. Die zum Teil negativen Werte für die Assoziation lassen sich mit einer stärkeren Assoziation an die Carboxylschicht auf der Referenzzelle erklären. Da auf der Referenzzelle der beiden Chips weniger Protein immobilisiert ist als auf der ligandenbeschichteten Zelle, kommt es zu einer negativen Differenz. Die stärkste Assoziation wurde für His Occ C gemessen. Diese Interaktion war jedoch nicht konzentrationsabhängig. Ein Grund könnte der basische His-tag des Proteins sein. Der His-tag kann bei einem pH Wert von 7,5 an die Carboxylgruppen der Matrix oder an Asparaginsäure und Glutaminsäureseitenketten der negativgeladenen Oberfläche von Occ C binden. Diese Interaktionen würden den Vorteil der geringeren sterischen Beeinträchtigung des Gesamtproteins durch das His-tag aufheben. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass der Occ C mit sich selbst interagiert und das die Proteinanhänge einen Einfluss auf die Interaktion haben.

### 3.4 Interaktion von Peptiden aus ZO-1 mit dem C-Terminus von Occludin

Für die Interaktion von ZO-1 mit Occ C wurden die  $\alpha$ -Helix 2 (H2) und die putative *coiled-coil* Helix 1 (cc1) aus ZO-1 SH3-*hinge*-GuK mit Peptidpositionsanalyse gefunden und mit SPR-Messungen als Bindungsregionen weiter charakterisiert (Schmidt et al. 2004). Um darüber hinaus strukturelle Informationen über die Bindung zu gewinnen, sollten die Peptide mit dem Occ C gemeinsam kristallisiert werden. Für die Kristallisation muss die Bindung der Peptide an den Occ C für mehrere Wochen in einem Temperaturbereich zwischen 4 und 18°C stabil sein, damit sich ein Kristall bilden kann. Durch die Experimente in 3.4.2 wurde die Beständigkeit der Interaktion getestet.

#### 3.4.1 Der Occ C bindet an Peptide aus der SH3-*hinge*-GuK-Einheit von ZO-1 im Oberflächenplasmonresonanz-Experiment

Occ C wurde auf einem CM4 Chip immobilisiert und mit den Peptiden cc1 und H2 aus ZO-1 sowie einem Peptid aus dem Kortikotropin-*releasing*-Hormon (CRF) als Negativkontrolle superfundiert. Da CRF von der Zelle sekretiert wird, sollte es nicht als natürlicher Bindungspartner des zytosolischen Occ C fungieren. Im SPR-Experiment wurden 28 fmol Occ C als MBP-Fusionsprotein und 6,8 fmol MBP als Referenz an einen CM4 Chip gebunden. In Abb. 37 ist die konzentrationsabhängige Assoziation der ZO-1-Peptide an Occ C dargestellt. Die RU-Erhöhung auf der Messzelle ist ein Maß für die gebundene Menge des Peptids an Occ C. Von diesem Wert wurde die RU-Erhöhung auf einer MBP beschichteten Referenzzelle abgezogen. Das Ergebnis ist der Mittelwert der Assoziation nach 320 Sek. gebildet aus vier Messungen.



**Abb. 37: Interaktion zwischen der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin und Peptiden aus der ZO-1 SH3-*hinge*-GuK-Einheit im Oberflächenplasmonresonanz-Experiment**

Mittels SPR-Spektroskopie wurden Interaktionsmessungen in vierfacher Ausführung zwischen der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin und den Peptiden H2 (Helix 2) und cc1 (*coiled-coil*1) aus der SH3-*hinge*-GuK-Einheit von ZO-1 durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Peptid aus dem CRF als Negativkontrolle analysiert. Es wurde der Anteil des gebundenen Peptids in [fmol] abhängig von der Konzentration [µM] des Peptids dargestellt. Für die Umrechnung in fmol wurde die Angabe des Herstellers Biacore zugrunde gelegt, dass ein Signalanstieg von 1000 RU 1 ng gebundenem Protein entspricht. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert (n=4).

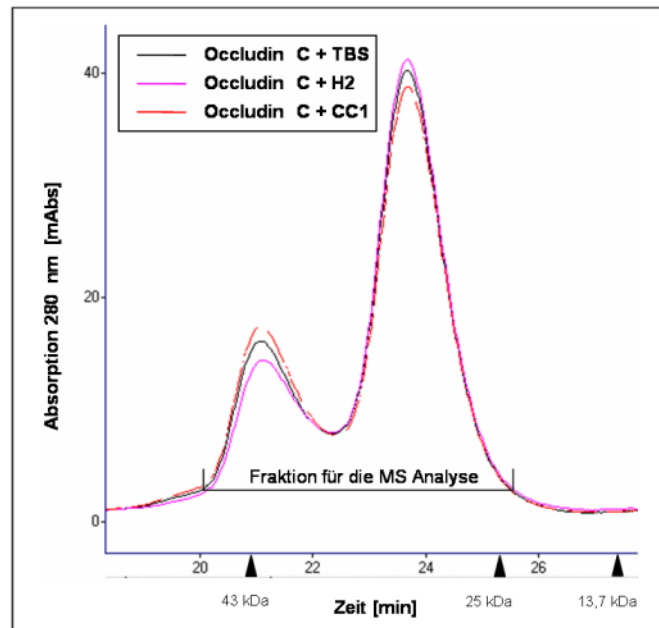
Es haben mehr cc1 Moleküle an Occ C gebunden als H2. Das CRF-Peptid bindet nicht an den Occ C.

## Ergebnisse

Eine quantitative Auswertung von SPR-Messungen ist nur bei genauer Kenntnis der Konzentration der Analyten möglich. Da die Konzentration der Peptide nur durch die Einwaage der lyophilisierten Peptide eingestellt wurde, ging der Anteil an gebundenem Wasser und Ionen im Lyophilisat mit ein, konnte aber nicht quantifiziert werden. Daher ist die Ermittlung von kinetischen Konstanten hier nicht zulässig. Es konnte gezeigt werden, dass die im Modell postulierten Bindungsregionen der Peptide aus der SH3-h-GuK-Einheit mit dem Occ C interagieren.

### 3.4.2 Stabilität des Komplexes aus ZO-1-Peptiden mit dem C-Terminus von Occludin

Die Stabilität des Komplexes aus ZO-1-Peptiden und Occ C ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Ko-Kristallisation. Deshalb wurde die Stabilität des Komplexes untersucht. Es wurde angenommen, dass bei einer stabilen Bindung die Peptide mit dem Occ C von der SEC-Säule eluieren. Der Occ C ( $c = 1,2 \text{ mg/ml} = 80 \text{ nM}$ ) wurde mit den Peptiden H2 ( $c = 1 \text{ mg/ml} = 330 \text{ nM}$ ) und cc1 ( $c = 1 \text{ mg/ml} = 290 \text{ nM}$ ) aus ZO-1 über Nacht bei  $8^\circ\text{C}$  inkubiert und danach auf die SEC-Säule geladen. Abb. 38 zeigt, dass die molekularen Populationen von Occ C mit den Peptiden die gleiche Verteilung auf zwei Absorptionsmaxima zeigten, wie die Kontrolle von Occ C ohne Peptid.



**Abb. 38: Größenausschlusschromatografie des Occludin C nach Inkubation mit Peptiden aus ZO-1**

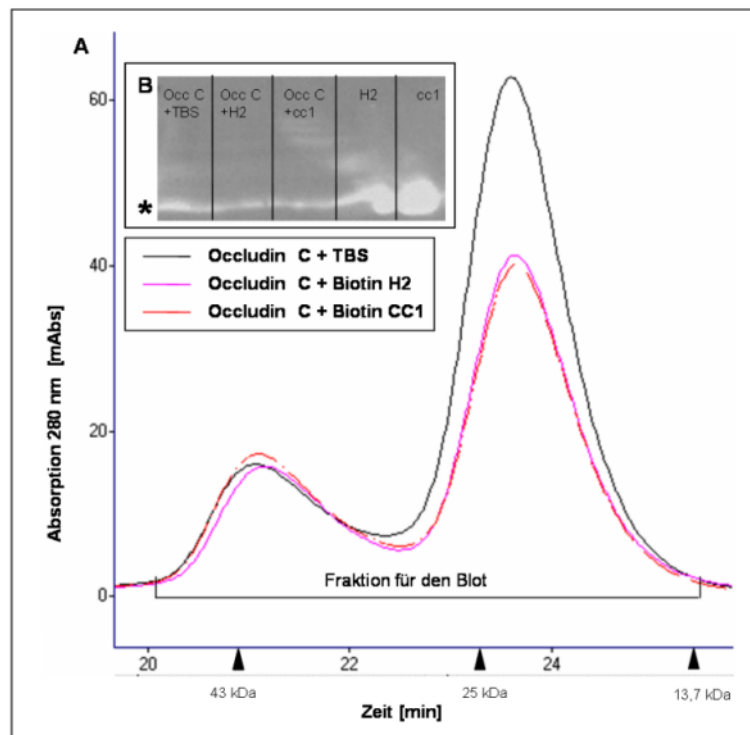
Occ C wurde mit den Peptiden H2 (violett) und cc1 (rot) gemischt und über Nacht bei  $8^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Gemische wurden auf eine Superdex 75 10/300 GL Säule geladen und bei einer konstanten Flussrate von  $0,5 \text{ ml/min}$  getrennt. Als Kontrolle wurde Occ C geladen (schwarze Linie). Alle Proben enthielten  $80 \text{ nM}$  Occ C und zeigten zwei Maxima mit denselben Retentionszeiten. Mit Pfeilen in der Zeitachse wurde die Retentionszeit der Markerproteine Ovalbumin ( $43 \text{ kDa}$ ) und Chymotrypsinogen A ( $25,3 \text{ kDa}$ ) und Ribonuklease A ( $13,7 \text{ kDa}$ ) eingefügt. MS= massenspektrometrische Analyse

Die Retentionszeiten lagen für das Dimer bei 21 Minuten und für das Monomer bei 23,8 Minuten (3.3.5). Es wurde keine Verschiebung der Retentionszeiten beobachtet, die auf größere Occ C-Peptid-Molekülkomplexe hinweisen würden. Da der Occ C-Peptid-Molekülkomplexe nicht zwangsläufig einen größeren hydrodynamischen Radius als Occ C aufweisen muss, könnten die Peptide dennoch in den Fraktionen mit dem Occ C enthalten sein. Die Fraktionen, die Occ C enthielten, wurden vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer konzentriert. Mit Massenspektrometrie wurde weder H2 noch cc1 in

## Ergebnisse

den Occ C enthaltenden Fraktionen nachgewiesen. Hohe Salzkonzentrationen in den Proben setzten die Empfindlichkeit der Messung herab. Es ist also nicht auszuschließen, dass die untersuchten Proben die gesuchten Peptide trotzdem beinhalteten.

Um die Peptide mit einer alternativen Methode nachzuweisen, wurden biotinylierte Peptide verwendet, die mit einem Antikörper im *Immuno*-Blot identifiziert werden sollten. Es wurde Occ C ( $c= 1,9 \text{ mg/ml} = 130 \text{ nM}$ ) mit Biotin cc1 ( $c= 1 \text{ mg/ml} = 270 \text{ nM}$ ) und Biotin H2 ( $c= 1 \text{ mg/ml} = 310 \text{ nM}$ ) inkubiert und durch SEC getrennt. Die Retentionszeiten betragen für das Dimer 21,1 Minuten und für das Monomer 23,7 min. Fraktionen, die Occ C enthielten, wurden gesammelt und mit dem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert. Die Konzentrate der jeweiligen Läufe wurden im *Immuno*-Blot untersucht (Abb. 39B).



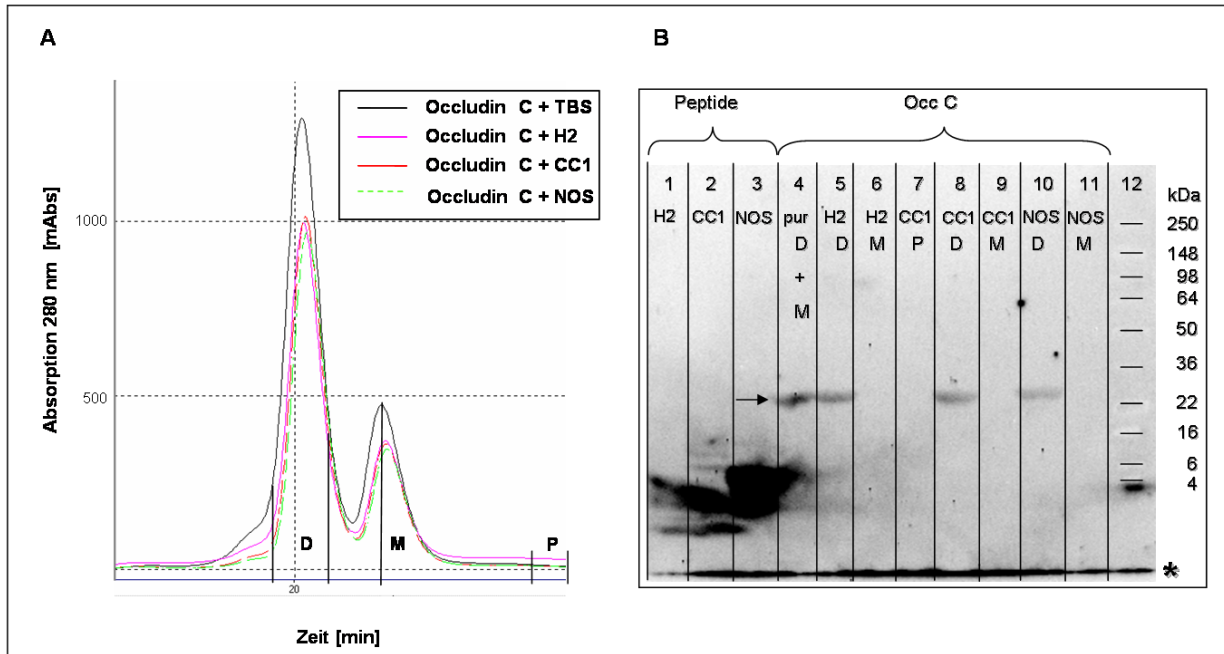
**Abb. 39: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin mit biotinylierten Peptiden aus ZO-1**

**A:** Occ C mit biotinylierter H2 (violett) und Occ C mit biotinylierter cc1 (rot), sowie Occ C ohne Peptid als Negativkontrolle (schwarz) wurden auf eine Superdex 75 10/300 GL Säule bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min getrennt. Die Fraktionen der Absorptionsmaxima wurden gesammelt. **B:** Im *Immuno*-Blot wurden die konzentrierten Occludin-Fraktionen mit Antikörper gegen Biotin gebunden und einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper detektiert. Auf dem *Immuno*-Blot sieht man von links nach rechts, Occ C + TBS (Negativkontrolle); Occ C + H2; Occ C + cc1; H2 und cc1 als Positivkontrollen. Der Stern markiert die Höhe der Lauffront.

Im *Immuno*-Blot (Abb. 39 B) ist zu erkennen, dass die Positivkontrollen ein starkes Signal zeigten. Zusätzlich gab es ein Signal auf Höhe der Lauffront, welches auch in der Negativkontrolle sichtbar war (Abb. 39 B \*). Der Versuch wurde mit einem Gradientengel (Abb. 40) wiederholt, um die Lauffront und die Peptide besser voneinander zu trennen. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde ein biotinyliertes Peptid aus der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in den Versuch eingeschlossen. Die Fraktionen aus der SEC von Occ C mit den biotinylierten Peptiden H2, cc1 und NOS (Abb. 40 A) wurden getrennt nach dem Maximum von Monomer und Dimer konzentriert und auf einem 4-20% Gradientengel

## Ergebnisse

analysiert (Abb. 40 B Spur 5-11 Dimer (D)+Monomer (M)). In der Probe Occ C mit cc1 wurde zusätzlich eine Fraktion auf Höhe der abgeschätzten Retentionszeit des Peptides cc1 konzentriert und im Gradientengel analysiert. Die Peptide hatten eine Größe von 3250 Da für H2, 3695 Da für cc1 und 3095 Da für NOS.



**Abb. 40: Größenausschlusschromatografie der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin inkubiert mit biotinylierten Peptiden aus ZO-1 und Nachweis der Peptide im *Immuno*-Blot**

**A** SEC-Läufe von Occ C und Occ C mit Peptiden. Die gesammelten Fraktionen (D= Dimer, M= Monomer P= putative Peptidfraktion) der einzelnen SEC-Läufe wurden konzentriert. **B** *Immuno*-Blot der SEC-Fractionen mit Antikörper gegen Biotin. Positivkontrollen: Spur 1 ZO-1 Helix 2 (H2), Spur 2 ZO-1 *coiled-coil* Helix 1 (cc1), Spur 3 Kontrollpeptid (NOS), Negativkontrolle Spur 4 Occ C + TBS; Spur 5-6: Occ C + H2; Spur 7-9: Occ C + cc1; Spur 10-11: Occ C NOS (Negativkontrolle), Spur 12 Proteinstandard. Mit dem Pfeil ist die Laufhöhe des Occludins gekennzeichnet. Der Stern markiert die Lauffront.

Der Antikörper detektierte die Peptide, die als Positiv-Kontrolle auf dem Blot mitgeführt wurden (Abb. 40 B Spur 1-3), sowie Banden mit der erwarteten Größe des Occ C-Dimers (Abb. 40 Pfeil). Das Signal in Spur 1 für H2 war im Vergleich zu cc1 und NOS sehr schwach. cc1 und NOS schienen in zwei Populationen vorzukommen. In der Fraktion mit Occ C-Monomer gab es kein Signal. Als Negativkontrolle wurde der Occ C ohne Peptid eingesetzt. Das Signal auf Höhe des Occ C-Dimer fand sich auch in der Occ C Negativkontrolle (Abb. 40, Spur 4). Dies deutet darauf hin, dass durch die Dimerisierung ein Epitop für den primären oder sekundären Antikörper geformt wird. Es ist anzumerken, dass die unspezifische Reaktion des Antikörpers mit Occ C die Detektion der Peptide wahrscheinlich nicht verhindern würde. Die Detektion der gesuchten Peptide müsste das Signal verstärken. Eine Erklärung für die Abwesenheit der Peptidsignale könnte eine niedrige Konzentration in der Occ C Fraktion sein.

Weder mit massenspektrometrischer noch mit immunologischer Methode konnte ein Komplex aus Occ C und Peptiden nachgewiesen werden.

### **3.4.3 Occludin C Titration mit Peptiden von ZO-1 zeigt keine Enthalpieänderung**

Mit isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) sollten Bindungskonstanten für die Interaktion der Peptide mit Occ C ermittelt werden. Dazu wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt, bei dem die Peptide cc1 oder H2 vorgelegt wurden und der Occ C dazu titriert wurde. Die Enthalpieänderung wurde als Temperaturänderung gemessen. Die Temperaturänderung für die Titration von Occ C mit cc1 war gleich der Änderung bei Verdünnung von cc1 mit Puffer. In diesem Experiment konnte keine Interaktion zwischen cc1 und dem Occ C gemessen werden. Die Wiederholung des Experiments mit H2 zeigte auch keine Bindung an den Occ C. Mit ITC ließen sich keine Interaktionsenthalpien bestimmen.

### **3.4.4 Kristallisation**

Eine Interaktion der Peptide aus der SH3-*hinge*-GuK-Einheit konnte im Oberflächenresonanz-Experiment bestätigt werden. Ein stabiler Occ C ZO-1-Komplex wurde mit Methoden, die die Interaktion im Gleichgewicht untersuchen, wie Größenausschlusschromatografie oder ITC nicht detektiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein Komplex aus Occ C und Peptiden nicht über einen für die Bildung von Kristallen notwendigen Zeitraum von Tagen bis Wochen stabil wäre. Deshalb wurde von einer Kristallisation abgesehen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die PDZ-Domänen von ZO-1

Viele Membranproteine an den Zellkontakten sind als Bindungspartner der PDZ-Domänen von ZO-1 identifiziert worden (s. Tab. 2). Für einige weitere wurde aufgrund ihres C-terminalen PDZ-Bindungsmotivs eine Interaktion mit ZO-1 vermutet. In dieser Arbeit wurde mit Peptidbibliotheken die Bindung der rekombinant erzeugten PDZ-Domänen 1 und 2 von ZO-1 an die C-Termini von Membranproteinen der Zellkontakte und *multidrug resistance* Proteinen untersucht.

In Experimenten konnten die Claudine 2, 8, 10, 14, 15 und 17 als Bindungspartner der PDZ 1-Domäne gefunden werden. Die Identifizierung der Claudine steht im Einklang mit den Untersuchungen von Zhang et al.(2006), die mit einem Phagen-*display*-Ansatz die Claudine 2, 8, 10, 14, 17 und 20 als Bindungspartner der PDZ 1-Domäne fanden. Cld 15 wurde zum ersten Mal als Bindungspartner der PDZ 1-Domäne *in vitro* identifiziert. Es hat eine physiologische Bedeutung in Epithelzellen des Dünndarms. Cld 15 *Knock out* Mäuse zeigen einen vergrößerten Dünndarm mit verminderter Anzahl von TJ-Strängen in diesem Bereich (Tamura et al. 2008). Die Bindungsstelle für die Proteine JAM B und C (Ebnet et al. 2003) an ZO-1 konnte zum ersten Mal konkret der PDZ 2-Domäne zugeordnet werden.

Die Erweiterung der Bindungsanalyse auf eine Peptidbibliothek mit 6223 C-Termini von humanen Proteinen erbrachte 86 Bindungsereignisse für die PDZ 1-Domäne und 92 Bindungsereignisse für die PDZ 2-Domäne. Für die PDZ 1-Domäne wurde mithilfe einer Zufallsbibliothek aus Peptiden im Phagen-*display* eine Konsensussequenz ermittelt (Zhang et al. 2006). Erstaunlich ist die starke Abweichung der meisten identifizierten C-Termini aus der Peptidbibliothek von der Konsensussequenz.

**Tab. 31: Konsensussequenz für Liganden der PDZ 1-Domäne aus ZO-1 und C-terminale Sequenzen von ZO-1 PDZ 1 bindenden Proteinen**

Φ steht für die Aminosäuren (F,Y,W,L,I,V,K,R). X symbolisiert eine beliebige Aminosäure. Abweichungen in der Sequenz der Claudine vom Konsensus wurden fett unterlegt.

Protein	Aminosäureposition						
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
Konsensus	Φ	x	Φ	(TSRK)	(TS)	(WY)	(VLI) <sub>COOH</sub>
Claudin 2	Y	S	L	T	<b>G</b>	Y	V
Claudin 8	Y	S	R	S	<b>Q</b>	Y	V
Claudin 10	F	D	K	<b>N</b>	<b>A</b>	Y	V
Claudin 14	Y	R	L	<b>N</b>	<b>D</b>	Y	V
Claudin 15	Y	G	R	<b>N</b>	<b>A</b>	Y	V
Claudin 16	Y	A	V	<b>D</b>	T	<b>R</b>	V
Claudin 17	K	T	<b>S</b>	T	S	Y	V
MCM7	R	T	R	<b>I</b>	T	<b>F</b>	V
HNRPD	<b>T</b>	F	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>P</b>
EIF3I	F	E	F	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
EIF3J	<b>Q</b>	D	Y	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>M</b>

## Diskussion

Die Arbeit von Zhang et al. (2006) zeigt, dass bei der Bindung von natürlichen Liganden an die PDZ 1 Ausnahmen von der Konsensussequenz toleriert werden. So entspricht kein gebundenes Claudin in allen Positionen der Konsensussequenz (s. Tab. 31). Ein weiteres Beispiel für die Toleranz der PDZ 1-Domäne bei der Bindung von Liganden ist Claudin 16. Claudin 16 enthält ein Arginin in Position -1 und bindet trotzdem an die PDZ 1. Selbst einen Austausch von Arginin gegen Alanin in Position -1 unterbricht die Bindung nicht (Ikari et al. 2004). Bei Untersuchungen zur Spezifität der Ligandenbindung von PDZ-Domänen verschiedener Proteine mit Peptidbibliotheken wurde festgestellt, dass das Adapterprotein  $\alpha$ -1-Syntrophin ein größeres Spektrum von C-Termini erkennt als beispielsweise Erbin (Wiedemann et al. 2004), welches eine spezielle Rolle als Suppressor im Ras/Raf Signaltransduktionsweg übernimmt (Kolch 2003). Das Adaptorprotein ZO-1 kommt an allen Zellkontakten vor und rekrutiert eine Vielzahl von Proteinen über seine PDZ-Domänen (s. Tab. 2). Es besitzt ebenfalls ein breiteres Bindungsspektrum als Erbin (Zhang et al. 2006). Die Erforschung des Ligandenspektrums der PDZ-Domänen mit bioinformatischen Methoden wird im Projekt „*PDZ domain ligand specificity, affinity and selectivity*“ gesondert verfolgt ([http://www2.fmp-berlin.de/nmr/pdz/pdz\\_index.html](http://www2.fmp-berlin.de/nmr/pdz/pdz_index.html)). Für die Untersuchungen wurden die Daten aus der Peptidbibliothek zur Verfügung gestellt.

In einem weiteren Versuch wurde eine Analyse von Bindungspartnern der PDZ-Domänen aus einem Epithelzelllysate durchgeführt. Das *pull-down* Experiment aus Rattenepithelzellen spiegelt die Situation in der Zelle besser wider als synthetische Peptidbibliotheken, weil vollständige Proteine gebunden werden und diese durch ihre Expression in der Zelle posttranslationale Modifikationen berücksichtigen können. Ein wichtiger Unterschied zur Peptidbibliothek ist, dass durch Bindung an Proteinkomplexe auch Proteine isoliert werden, die nicht direkt mit der PDZ-Domäne interagieren. Es wurden ca. 650 Proteine mit Massenspektrometrie für jede PDZ-Domäne identifiziert. In der Peptidbibliothek und der Analyse aus Epithelzelllysate wurden elf Proteine doppelt identifiziert (s. Tab. 27). Darunter waren die beiden Serin/Threonin Proteinphosphatasen 2A (P2AA) und 4 (PPP4), die als Bindungspartner der PDZ 2-Domäne gefunden wurden. Für die P2AA wurde die Dephosphorylierung von ZO-1, Occludin und Cld 1 nachgewiesen. Die Dephosphorylierung führte zur erhöhten parazellulären Permeabilität der TJ (Nunbhakdi-Craig et al. 2002; Seth et al. 2007). Eine Bindung der P2AA an die PDZ 2-Domäne des Gerüstprotein ZO-1 könnte die Rekrutierung an die TJ erklären. Die Sequenz der PPP4 in Mammalia ist zu 65% mit der P2AA identisch. Dies deutet auf eine teilredundante Funktion der Phosphatasen hin (Cohen et al. 2005). In Hefen wurde ein vermindertes Wachstum beobachtet, wenn orthologe Phosphatasen der PPP4 ausgeschaltet wurden (Ronne et al. 1991; Stark 1996). Die Serin/Threonin Phosphatase 4 reguliert die Aktivität der GTPasen Rac1 und Cdc42 (Martin-Granados et al. 2008), die wiederum die Struktur von Aktin beeinflussen. Störungen in der Struktur des Aktinzytoskeletts führen zu einer Behinderung bei der Ausbildung von Zellkontakten und beeinflussen die parazelluläre Permeabilität (Fanning et al. 2002). Verschiedene Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen der Assoziation von ZO-1 mit unterschiedlichen aktinreichen Strukturen in der Entstehungsphase der Zellkontakte (Anderson et al. 1989; Fleming et al. 1989; Vasioukhin et al. 2000; Yonemura et al. 1995). Zusätzlich zeigen Untersuchungen von Ikenouchi *et al.* (2007) in Epithelzellen ohne ZO-Proteine, dass die Aktivierung von Rac1 gestört war. Rac1 spielt eine entscheidende Rolle beim Übergang von fibroblastenartigen Vorläufern der *adherens junctions* zum



polarisierten epithelialen gürtelförmigen *adherens junction* Typ. Dies deutet auf einen direkten Einfluss der PPP4 auf die Organisation der Zellkontakte über ZO-1 hin. Die Interaktion der Phosphatasen mit ZO-1 und ihr Beitrag zur Entstehung von Zellkontakten sollten in zukünftigen Untersuchungen in Zellen geprüft werden.

Weitere doppelt identifizierte Proteine konnten aus dem gegenwärtigen Stand der Literatur nicht mit Zellkontakten in Verbindung gebracht werden. Als Bindungspartner der PDZ 1-Domäne von ZO-1 wurden der *DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM7* und das heterogene nukleare Ribonukleoprotein *UP2* (HNRPD) sowie zwei Translationsfaktoren identifiziert. *MCM7* ist ein nukleares Protein und wird für die DNA-Replikation und Zellproliferation benötigt. Es spielt eine Rolle bei der Reparatur von DNA (Tsao et al. 2004). Der C-Terminus stimmt in den letzten sieben Aminosäuren mit Ausnahme der Positionen -1 und -3 mit der Konsensussequenz der PDZ 1 überein (Tab. 31). Das HNRPD ist im Zellkern an der Bindung von DNA und RNA beteiligt und fungiert als Transkriptionsfaktor (Nagata et al. 1999; Tolnay et al. 1999). Die C-terminalen Aminosäuren weichen in allen wesentlichen Positionen vom Konsensus der PDZ 1-Domäne ab (Tab. 31), was auf eine Wechselwirkung unabhängig vom klassischen PDZ-Bindungsmechanismus schließen lässt.

Die Einheiten 1 und 2 des eukaryotischen Translationsfaktors 3 gehören zur 40-S-Untereinheit der Ribosomen. Es sind zytosolische Proteine, deren Aufgabe die Proteinbiosynthese ist. Sie fördern die Bindung von Methionyl-tRNAs an das Ribosom (Asano et al. 1997). Die C-Termini weichen ebenfalls stark von der Konsensussequenz ab. Die Peptide wurden auch von der PDZ 2-Domäne als Bindungspartner identifiziert, was eine unspezifische Interaktion wahrscheinlich macht.

Weitere ubiquitäre Proteine die als Bindungspartner der PDZ 2-Domäne identifiziert wurden, sind Elongationsfaktor 1- $\beta$  und das 60S ribosomale Protein L13A, sowie zwei Proteine die am Abbau anderer Proteine im Zytosol beteiligt sind, die Tripeptidylpeptidase II und die 26S Protease regulatorische Untereinheit 4. Das diese allgegenwärtigen Proteine in der Massenspektrometrie identifiziert wurden, kann daran liegen, dass sie zu den häufigsten Proteinen in der Zelle gehören. Die Anreicherung von Proteinen im *pull-down*-Experiment hängt von der Affinität zur PDZ-Domäne und der Konzentration des Proteins im Zelllysate ab. Zytosolische Proteine ergeben nach dem Verdau oft gut ionisierbare hydrophile Peptide. Die Peptide in der Massenspektrometrie werden ab einem Schwellenwert der Intensität defragmentiert. Peptide, die in größerer Menge vorkommen und gut ionisierbar sind, erreichen den Schwellenwert schneller und werden somit häufig detektiert. Das elfte identifizierte Protein ist die 65 kDa Untereinheit des *Splicing* Faktor U2AF. U2AF ist ein Kernprotein und am Transport von mRNA aus dem Zellkern beteiligt.

Um Proteine, die unabhängig vom klassischen PDZ-Bindungsmechanismus mit der Domäne interagieren, von den anderen zu unterscheiden, wäre eine Kontrolle nötig. Die Kontrolle könnte aus einer PDZ-Mutante mit Austausch von Aminosäuren in der Bindungstasche bestehen, die nicht mehr an C-terminale Liganden bindet. Im Vergleich vom Wildtyp zur Mutante könnten falsch positive Proteine ausgeschlossen werden, die durch eine Bindung außerhalb der Bindungstasche angereichert werden.

Unter den doppelt identifizierten Proteinen befindet sich kein Membranproteine, obwohl sie zu den am besten charakterisierten Bindungspartnern der PDZ-Domänen von ZO-1 gehören. Das kaum Membranproteine der Zellkontakte im *pull-down*-Experiment identifiziert wurden hat wahrscheinlich

methodische Gründe. Membranproteine müssen für eine Anreicherung im *pull-down*-Experiment aus den Membranen solubilisiert werden. Im Lysepuffer der Epithelzellen wurde ein Prozent Triton X 100 eingesetzt. Über die Wahl des effektivsten Detergens bei der Präparation von Membranproteinen gibt es in der Literatur verschiedene Meinungen (Garavito und Ferguson-Miller 2001; Seddon et al. 2004). Eine Optimierung der Präparation von Membranproteinen könnte durch den Einsatz unterschiedlicher Detergenzien erreicht werden. Ein weiteres Problem stellt die Identifizierung der hydrophoben Membranproteine dar. Hydrophobe Bereiche enthalten sehr selten die geladenen Aminosäuren Arginin oder Lysin. Eine Spaltung mit Trypsin nach diesen Aminosäuren ist jedoch Voraussetzung für die Entstehung von Peptiden geeigneter Größe für die Messung in der Massenspektrometrie. Um bestimmte Membranproteine gezielter nachzuweisen, kann man im Immuno-Blot mit Antikörpern nach ihnen suchen.

### **4.1.1 Regulation der Interaktion von PDZ-Domänen aus ZO-1 an die C-Termini von Membranproteinen**

Die Phosphorylierung an C-terminalen Aminosäuren verschiedener Claudine hat einen Einfluss auf deren Funktion und Lokalisation (Gonzalez-Mariscal et al. 2008). Ein Zusammenhang zwischen posttranslationaler Modifikation und Ko-Lokalisation mit ZO-1 wurde zum Beispiel für Cld 4 beschrieben. Phosphorylierung von Thr208 in der Position -2 unterband die Ko-Lokalisation und förderte die Permeabilität der TJ (Tanaka et al. 2005). Eine neue Synthesemethode erlaubt seit Kurzem die Herstellung von Peptiden mit phosphorylierten Aminosäuren (Tapia et al. 2008). Es wäre interessant mit einer Peptidbibliothek, die die Phosphorylierung der C-Termini von Claudinen berücksichtigt, die Interaktion an die PDZ 1-Domäne zu untersuchen. Auf diese Weise könnte die Regulation der Bindung von Claudinen an ZO-1 genauer beleuchtet werden.

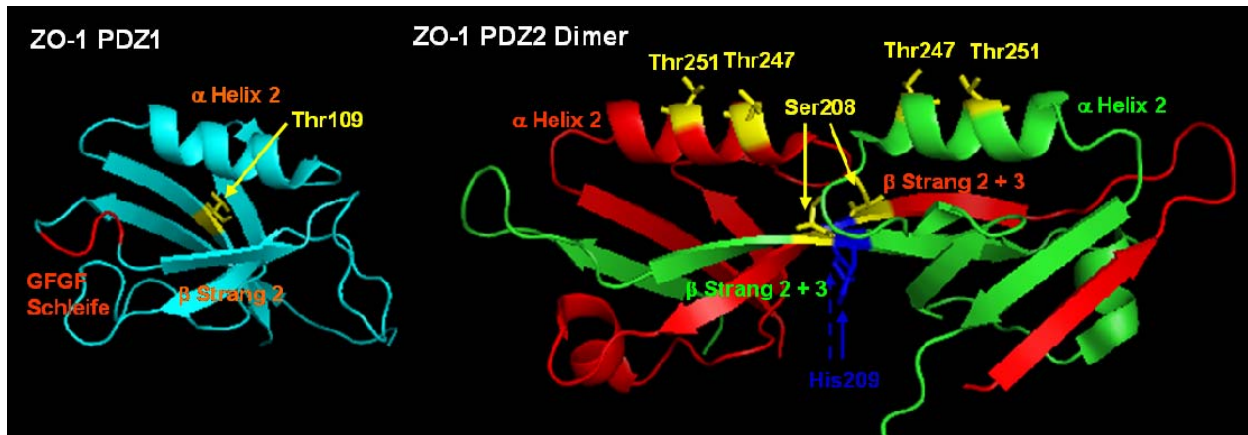
Auch eine Modifikation der PDZ-Domäne kann Auswirkungen auf das Bindungsverhalten haben. Es wurde für die PDZ 1-Domäne des Natrium-Kalium-Austausch-regulierenden-Faktors (NHERF) gezeigt, dass eine Phosphorylierung der PDZ-Domäne in der  $\alpha$ -Helix 2 zu einem veränderten Bindungsverhalten der PDZ-Domäne führt (Voltz et al. 2007). Um diese Möglichkeit der Regulation zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit möglicherweise phosphorylierte Serine und Threonine in den PDZ-Domänen von ZO-1 durch bioinformatische Vorhersagen identifiziert (s. Tab. 29). Die Proteinkinase C, die einen nachgewiesenen Effekt auf die die Integrität der TJ hat (Avila-Flores et al. 2001; Stuart und Nigam 1995), wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit als Enzym für eine Phosphorylierung von Serinen und Threoninen in den PDZ-Domänen vorhergesagt (s. Tab. ). *In vitro* wurde die Phosphorylierung durch Isoformen der PKC mit radioaktivem ATP nachgewiesen. Die PKC-Isoformen unterscheiden sich nur gering in den Konsensussequenzen, die sie phosphorylieren (Nishikawa et al. 1997). Die geringen Unterschiede können die Erklärung für die Phosphorylierung der PDZ-Domänen durch alle verwendeten PKC-Isoformen *in vitro* sein. Die Konsensussequenzen der PKC-Isoenzyme sind in Tab. 32 dargestellt. Die stärkste Aktivität zeigten die Isoformen PKC $\alpha$  und  $\eta$ .

**Tab. 32: Konsensussequenzen der PKC $\alpha$  und  $\eta$  im Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der phosphorylierten Aminosäuren der PDZ 1 Thr109 und PDZ 2 Ser208**

Die Konsensussequenzen der PKC wurden Nishikawa et al. (2007) entnommen. Sie wurden durch *in vitro* Phosphorylierung von Peptiden der Sequenz M-A-X-X-X-R-X-X-S-X-X-X-A-K-K-K ermittelt. X steht für eine beliebige Aminosäuren mit Ausnahme von W,C,S,T.

Protein	Aminosäureposition												
	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
Konsensus					R	X	X	S/T	X	R	X		
PKC $\alpha$	R	R/F	R/L/F	R/F	R	K/Q/R	G/A/M	S/T	F/M/I/L/V	R/K	R/K	K/R	A/K
PKC $\beta$ I	R/K/F	K/R	L/R/F	K/R/F	R	K/Q/R/A	G/A/K	S/T	F/M/I/V	K/R/F	K/F/R	F/V	A/F
PKC $\beta$ II	Y	K	L/F	K/R	R	K/Q/E	G/K/M	S/T	F/M/L	K/R/F/M	K/Y/F/R	K/F	A/F/K/M
PKC $\gamma$	R	R/K	R/F	R/K	R	K/R/Q	G/K/A	S/T	F/K/M	K/R	R/K	K/R	A/K/R
PKC $\delta$	A	A/R/K	R	K/A	R	K/E/Q	G/A/K	S/T	F/M/V	F/K/M	Y/F	G/F/V	G/F
PKC $\epsilon$	Y/E	Y/K	X	K/A/Q	R	K/E/R/D	M/K	S/IT	F/I/M/V/L	F/A	E/Y/D/F	F/E	D/E/F
PKC $\eta$	A/R	R/A	L/R	R/K	R	R/K/Q	R/G	S/T	F/R/M	R/Y/M	R/Y	X	R
PKC $\zeta$	R	R/K	F/L/R	K/F	R	Q/K/Y	G/K/M/Y	S/T	F/M	F/M	Y/F/K	F/Y/K	F/K/Y
PKC $\mu$	A/Y	A/K/P	L/V	V/L/A	R	Q/K/E/M	M/L/K	S/T	V/M/L	A/M/V	F/Y	F/V/A	F/P/M
PDZ 1 T109	S	G	K	N	A	K	I	T	I	R	R	K	K
PDZ 2 S208	E	Y	G	L	R	L	A	S	H	I	F	Y	K

In Darmepithelzellen wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von PKC $\alpha$  durch den Toll like Rezeptor 2 eine verstärkte Lokalisation von ZO-1 an den TJ und einen erhöhten TER zur Folge hatte (Cario et al. 2004). Deshalb wurde für die PKC $\alpha$  eine *in vitro* Phosphorylierung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der betroffenen Aminosäuren durchgeführt. Es zeigte sich eine Phosphorylierung in der Position Thr109 der PDZ 1-Domäne. Die Auswirkungen der Phosphorylierung wurden durch einen Austausch von Thr109 gegen Glutamat weiter erforscht. Die Mutation täuscht durch das Einfügen einer negativen Ladung eine Phosphorylierung des Threonins vor. Die Mutante zeigte in der Größenausschlusschromatografie die gleiche Elutionszeit wie der Wildtyp. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Mutation keine größere Veränderung der Struktur aufgetreten ist, die zu einer Fehlfaltung oder Aggregation hätte führen können. Die Analyse des Bindungsmusters mit einer Peptidbibliothek von Membranproteinen der Zellkontakte zeigte eine leichte Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Es wurden die Claudine 2, 8, 10, 12 und 14 erkannt. Claudin 12 wird in Epithel- und Endothelzellen des Gehirns, Gastrointestinaltrakt und im Innenohr exprimiert. Seine Funktion konnte bisher nicht geklärt werden (Krause et al. 2008).



**Abb. 41: Position der mutierten Aminosäuren in den PDZ-Domänen 1 und 2 von Zonula Occludens 1**

Die Abbildungen wurden auf Grundlage der Strukturen der PDZ 1-(Appleton et al. 2006) und PDZ 2-(Fanning et al. 2007b) Domänen von ZO-1 erstellt und mit dem Programm pymol (Delano scientific LLC) bearbeitet. Die modifizierten Aminosäuren sind farbig dargestellt.

Bei der PDZ 2-Domäne wurde das Ser208 als Phosphorylierungsstelle identifiziert. Diese Aminosäure liegt im  $\beta$ -2 Strang der PDZ 2-Domäne, welcher maßgeblich an der Dimerisierung der Domäne beteiligt ist (s. Abb. 41). Darüber hinaus bildet der  $\beta$ -2 Strang einen Teil der Bindungstasche für den Liganden. Es bleibt zu prüfen, ob ein Austausch von Ser208 gegen Glutamat einen Einfluss auf die Dimerisierung der Domäne und die Ligandenbindung hat.

In der  $\alpha$ -Helix 2 der PDZ 2-Domäne gibt es zwei Threonine (s. Abb. 41). Die Untersuchungen von Voltz et al. (2007) zeigten, dass eine Phosphorylierung einer PDZ-Domäne von NHERF in dieser Position die Bindung an Liganden beeinflusst. Durch Austausch von Threonin gegen Glutamat in der  $\alpha$ -Helix 2 von PDZ 2 wurde eine Phosphorylierung der Threonine imitiert. Die Inkubation der Mutanten mit einer Peptidbibliothek aus 51 Membranproteinen zeigte in zwei Versuchen jeweils einen deutlichen Unterschied im Bindungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante T251E zeigte gar keine Interaktion mit den Peptiden, T247E interagiert nur noch mit JAM C. Die Elutionszeit der mutierten PDZ-Domänen in der SEC entsprach denen des Wildtyps. Das deutet darauf hin, dass die Mutationen keine Strukturänderungen bewirkten, die zu einer Entfaltung oder Präzipitation der Domänen hätte führen können.

Weitere Aufklärung über strukturelle Veränderungen kann die CD Spektroskopie liefern. Sollten in den Spektren keine wesentlichen Veränderungen der Sekundärstruktur detektierbar sein, wäre eine Ko-Kristallisation der PDZ 2-Domäne mit einem natürlichen Liganden wie JAM B interessant. Dadurch könnten mehrere offene Fragen beantwortet werden. Zum Einen, wie die Phosphorylierung der Serine an der Außenseite der  $\alpha$ -Helix 2 die Bindung an den Liganden beeinflussen. Zum Zweiten, ob ein Dimer der PDZ 2-Domäne einen oder zwei Liganden bindet. Eine weitere Besonderheit der PDZ 2-Domäne ist das Fehlen der GLGF-Schleife, die bei klassischen PDZ-Domänen die Carboxygruppe des C-Terminus vom Liganden bindet. Die Kristallisation mit Liganden kann zeigen, wie die Bindung des C-Terminus trotz fehlender GLGF-Schleife erreicht wird.

#### 4.1.2 Selbstinteraktion der PDZ 2-Domäne in lebenden Zellen

In HEK 293-Zellen, die keine TJ ausbilden, wurde die Interaktion der PDZ 2-Domäne mit sich selbst mit der Akzeptor-Bleich-Methode nachgewiesen (Gagell 2008). Die PDZ 2-Domänen der ZO-Proteine weisen einen einzigartigen Dimerisierungsmechanismus auf. Die Struktur der PDZ 2-Domäne zeigt einen  $\beta$ -Strang 2, der direkt in den  $\beta$ -Strang 3 übergeht (Abb. 41 PDZ 2). In den bisher bekannten Strukturen von PDZ-Domänen gibt es zwischen dem  $\beta$ -Strang 2 und 3 eine  $\beta$ -Kehre (Abb. 41 PDZ 1). Durch den vereinigten  $\beta$ -Strang 2+3 in der PDZ 2-Domäne wird die Selbstinteraktionsfläche gebildet. Der  $\beta$ -Strang 2+3 enthält an Position 209 ein Histidin. Anstelle des His209 ist in monomeren Strukturen von PDZ-Domänen häufig ein Glycin zu finden (Fanning et al. 2007b). Glycin ist ein Bestandteil von  $\beta$ -Kehren. Die Fragestellung lautete, ob durch den Austausch von Histidin 209 gegen Glycin eine monomere Struktur entstehen würde, die die Dimerisierung verhindert.

Mit der Akzeptor-Bleich-Methode wurde gezeigt, dass ein Austausch von Histidin gegen Glycin in Position 209 (PDZ 2-Mutante) keine Auswirkung auf die Selbstinteraktion der PDZ 2-Domäne hat. Sowohl die PDZ 2-Mutante zeigte eine Interaktion im FRET als auch die Mischung aus PDZ 2 und PDZ 2-Mutante. Das deutet daraufhin, dass der Austausch von Histidin 209 nicht zu einer  $\beta$ -Kehre zwischen  $\beta$ -Strang 2 und 3 geführt hat. Auffällig waren die geringen FRET-Werte der PDZ enthaltenden FRET-Paare verglichen mit der Kontrolle aus einem YFP-CFP-Fusionsprotein (s.Tab. 23).

Einige Bedingungen, die FRET-Werte in den Zellen beeinflussen, wurden in der Arbeit von C. Gagell (2008) systematisch untersucht. So stellte sie im *Immuno*-Blot fest, dass ZO-1 Fusionsproteine in der Zelle zum Teil nur unvollständig vorlagen. Das heißt, mit einem Antikörper gegen den fluoreszierenden Teil des Proteins wurde ein Protein detektiert, welches kleiner war als das gesamte Fusionsprotein. Es trug somit zur Fluoreszenz bei, aber nicht zur Interaktion. Denkbar ist auch ein Protein, welches ein unvollständiges Fluorophor und eine komplette PDZ-Domäne besitzt. Dieses Protein würde durch Interaktion mit einem intakten FRET-Partner Bindungsstellen blockieren, aber nicht zum FRET beitragen. Die Verkürzungen können durch unvollständige Expression oder Abbau der Proteine auftreten. Trotz Transfektion der HEK-Zellen mit gleichen Mengen von YFP- und CFP-Fusionsprotein kodierendem Plasmid, war die Expression der einzelnen FRET-Partner unterschiedlich. Dies kann an der Konzentrationsbestimmung der DNA gelegen haben, am Abbau der Proteine und an der Präparation der DNA. DNA-Präparationen des gleichen Plasmids zeigten bei gleicher Menge Plasmid zum Teil deutliche Unterschiede in der Expressionseffizienz in transfizierten HEK-Zellen. Ein weiterer Grund für niedrige FRET-Werte ist die unterschiedliche Aufnahme der Plasmide durch die Zellen. So gab es Zellen, die nach Ko-Transfektion eines Zellverbandes nur CFP oder YFP-fusioniertes Protein exprimierten.

Eine weitere Begründung für schwankende Messergebnisse mit zum Teil negativen FRET-Werten, liegt in der Messmethode. Die FRET-Partner sind im Zytosol verteilt. Für die Messung wird ein Bereich in der Zelle beliebig festgelegt. In diesem Bereich wird zu Beginn der Messung das YFP ausgebleicht. Bei FRET-Paaren steigt die Fluoreszenz des CFP an. Der Messvorgang bis zur Detektion der CFP-Fluoreszenz dauert eine Minute. In dieser Zeit diffundieren ausgebleichte FRET-Paare aus dem Bereich heraus und andere, die nicht geblichen wurden, hinein. Bei ungebleichten

FRET-Paaren ist weiterhin eine Übertragung der Energie auf das YFP möglich. Dieser Effekt führt zur Detektion von geringerer CFP-Fluoreszenz.

#### 4.2 Die Oligomere der SH3-h-GuK-Einheit

In der Arbeit von Müller et al. (2005) wurde für die SH3-h-GuK-Einheit von ZO-1 ein Oligomerisierungsmechanismus nach Vorbild des Domänenaustauschs bei dem MAGUK-Protein PSD 95 vorgeschlagen (McGee et al. 2001). Demnach soll die SH3-h-GuK-Einheit in der Lage sein, an sich selbst zu binden und so Stränge zu bilden. Diese linearen Stränge aus ZO-1 Molekülen sollen auf der zytosolischen Seite die TJ-Strangbildung unterstützen. *In vitro* wurde mit SPR nachgewiesen, dass MBP-Fusionsproteine der SH3-h-GuK-Einheit an sich selbst und eine Verkürzung aus MBP-h-GuK binden.

Eine Auswertung kinetischer Konstanten aus den SPR-Daten war nicht möglich, da die Konzentration der ZO-1 MBP-Fusionsproteine aus mehreren Gründen nicht genau bestimmt werden konnte. Die ZO-1 Proben zeigten eine starke Absorption bei 260 nm. Dies deutet auf eine zusätzliche Anreicherung von Nukleinsäuren in der Probe hin. Die Konzentration der Nukleinsäuren konnte durch Einsatz von nukleinsäureabbauenden Enzymen nicht vermindert werden. Eine spezifische Bindung der DNA an die GuK-Domäne, wie für das MAGUK Protein CASK gezeigt wurde (Hsueh et al. 2000), ist unwahrscheinlich, da auch MBP-SH3-Domäne eine Anreicherung von Nukleinsäuren zeigte. Die Anreicherung war jedoch deutlich geringer als bei Fusionsproteinen, die die GuK-Domäne enthielten. Zusätzlich enthielten die affinitätsgereinigten Proteine einen Anteil MBP. Deshalb konnte nur eine Konzentration des Proteingemisches ermittelt werden.

Um die Größe der Oligomere sowie deren Beschaffenheit genauer zu untersuchen, wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Dynamische Lichtstreuung erbrachte für alle Fusionsproteine eine Mischung aus unterschiedlich großen Oligomeren. Hinweise auf eine lineare Polymerisation gab es nicht (persönliche Information K.Gast/Potsdam).

Eine Ursache für die heterogene Mischung aus Oligomeren könnte eine Aggregation der Proteindomänen sein. Die Aggregation kann ausgelöst werden durch Fehlfaltungen. Wie in der Kristallstruktur von PSD 95 gezeigt wurde, wird die SH3-Domäne in der SH3-h-GuK-Einheit sowohl durch die *hinge* zwischen  $\beta$ -Strang D und E als auch durch die GuK-Domäne zwischen  $\beta$ -Strang E und F unterbrochen (McGee et al. 2001). Damit stellt die SH3-h-GuK-Einheit eine für MAGUK Proteine einzigartige Struktur dar. In dieser Struktur ist die Festlegung von Domänengrenzen durch die Vermischung der Domänen erschwert. Eine Ursache der Fehlfaltung kann die Wahl der Domänengrenzen sein. Ein Ansatz die Löslichkeit der Domänen zu erhöhen, wäre die Domänen mit unterschiedlichen Grenzen zu klonieren und ihre Löslichkeit einzeln zu testen (Scheich et al. 2004).

Ein weiterer Grund für die Beeinträchtigung der Faltung könnte die organismusfremde Expression der eukaryotischen ZO-1-Domänen in *E. coli* sein. ZO-1 Verkürzungen die die SH3-h-GuK-Einheit enthielten und in Insektenzellen exprimiert wurden, zeigten eine zehnfach stärkere Bindung an Occludin als aus *E. coli* stammende Proteine (Fanning et al. 2007a). Dies deutet auf die Bedeutung der Prozessierung des Proteins in Eukaryoten hin. Ein in Insektenzellen exprimierter Abschnitt von ZO-1, der die PDZ 3-Domäne, SH3-h-GuK-Einheit und die saure Region umfasst, lag *in vitro* als Monomer vor (Utepbergenov et al. 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die GuK-Domäne und die *hinge*-GuK-Einheit im *pull-down*-Experiment an die SH3-Domäne nicht aber an die gesamte SH3-h-

GuK-Einheit einschließlich der sauren Region binden (Fanning et al. 2007b). Diese Versuche deuten darauf hin, dass für die Selbstinteraktion der SH3-h-GuK-Einheit ein Modulator benötigt wird. Dieser Modulator fördert den Domänenaustausch von einer geschlossenen Konformation der SH3-h-GuK-Einheit zu einer offenen Form. Für weitere Untersuchungen zum Domänenaustausch müssen monomere Verkürzungen der SH3-h-GuK-Einheit und ihrer Domänen geschaffen werden. Eine Klonierung der ZO-1-Domänen zur Expression in eukaryotischen Zellen wäre dafür ein Ansatz.

### 4.3 Selbstinteraktion von Occludin

Die Selbstinteraktion von Occludin wurde in HEK 293-Zellen mit FRET nachgewiesen (Blasig et al. 2006). In dieser Arbeit wurde der Beitrag der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin zur Selbstinteraktion *in vitro* untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass zwei Cysteine (C408 und C499), die in diesem Abschnitt enthalten sind, disulfidverbrückte Dimere bilden können.

Analysiert man den Occ C unter nichtreduzierenden Bedingungen in einem PAA-Gel sind mehrere Banden (s. Abb. 30) zu erkennen. Ein *Immuno*-Blot mit einem Antikörper gegen den Occ C identifizierte die Banden als Mischung aus Oligomeren des Occ C. Im Vergleich zu Markerproteinen konnte den vier reproduzierbar auftretenden Banden ein apparentes Molekulargewicht von ca. 40, 30, 20 und 15 kDa zugeordnet werden. Die Banden des Occ C ließen sich durch Reduktion der Cysteine auf eine Bande bei 20 kDa verringern. Die Reduktion mit Glutathion erfolgte im Konzentrationsbereich zwischen 1-10 mM. Dies entspricht der Glutathionkonzentration in der Zelle (Kosower und Kosower 1978).

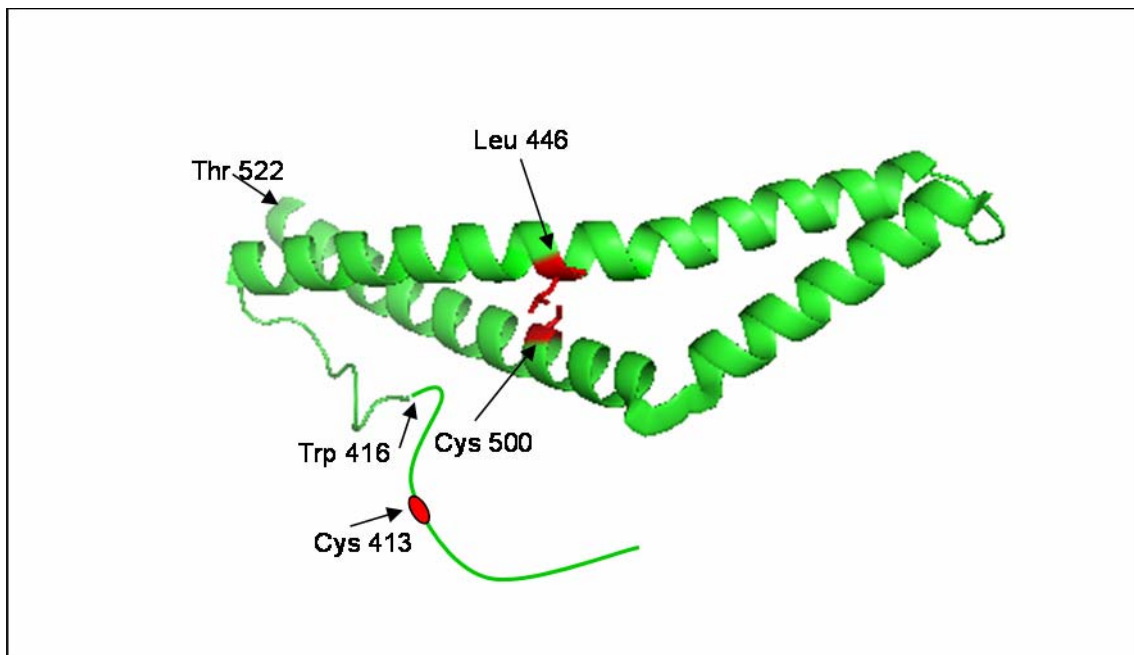
Der Occ C hat ein Molekulargewicht von 14,6 kDa. Das apparente Molekulargewicht der reduzierten Form von 20 kDa in der SDS-PAGE deutet darauf hin, dass die Moleküle durch das SDS nicht vollständig in ein Zufallsknäuel (random-coil) überführt wurden. Die Banden höheren Molekulargewichts können durch die Ausbildung von ein oder zwei intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen verursacht werden. Die Bande bei 15 kDa kann durch eine intramolekulare Disulfidbrücke verursacht werden. Die vier Banden ließen sich mit SEC in zwei Maxima teilen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Wie die Molekülpopulationen im PAA-Gel entsprechen sie im Vergleich mit globulären Markerproteinen nicht dem erwarteten hydrodynamischen Radius, sondern zeigten einen höheren apparenten hydrodynamischen Radius.

Statische Lichtstreuung ergab, dass das mittlere Molekulargewicht der Occludin-Moleküle einer Mischung aus Monomeren und Dimeren entsprach (Tab. 30). Für die Occludin-Moleküle in der Lösung wurde ein mittlerer hydrodynamischer Radius gemessen, der größer war als für globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von 14,6 kDa zu erwarten. Aus den Informationen über das Molekulargewicht und den hydrodynamischen Radius lässt sich auf eine elongierte Form des Occ C schließen. Die Abweichung von der globulären Form kann das apparente Laufverhalten in der SEC erklären. Diese Befunde decken sich mit den Annahmen aus dem Modell von Occ C und der Kristallstruktur, die ein langes Stäbchen aus drei  $\alpha$ -Helices zeigen (Li et al. 2005; Muller et al. 2005).

Durch die Blockierung der Cysteine mit 4-Vinylpyridin konnte der Einfluss der Thiolgruppen auf die Oligomerisierung verifiziert werden. Occ C mit blockierten Cysteinen lag als Monomer in Lösung vor. Die Blockierung der Cysteine beeinflusste die Sekundärstruktur nicht.

Die Kristallstruktur von humanem Occludin (413-522), welches nur ein Cystein in Position 500 enthält, und humanem Occludin (383-522), mit Cysteinen in Position 410 und 500 zeigten ein Monomer. Die

Reinigung der Proteine für die Kristallisation erfolgte in Gegenwart von 10 mM DTT (Li et al. 2005). Entsprechend den in dieser Arbeit beschriebenen Befunden zur Rolle der Reduktionsbedingungen bei der Dimerbildung war eine monomere Struktur zu erwarten. Im Kristall (AS 383-522) wurde der Bereich N-terminal der Aminosäure 416 als ungeordnet gefunden. Dieser Umstand könnte unter weniger reduzierenden Bedingungen die Dimerisierung des Cystein 413 erleichtern, da es verglichen mit dem Cystein 500, welches in der  $\alpha$  Helix 3 zu liegen kommt, leichter zugänglich ist. Cystein 500 ist im Kristall an der Ausbildung des *coiled-coil* mit der  $\alpha$  Helix 1 beteiligt. Es bildet dort mit der Seitenkette von Leucin 446 eine Wasserstoffbrücke. Die Seitenkette des Cystein 500 ist dadurch für eine Interaktion schwer zugänglich (Abb. 42). Die Dimere, die unter Beteiligung des Cystein 500 zustande kommen, könnten somit fehlgefaltet sein.



**Abb. 42: Kristallstruktur der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Occludin**

Die Abbildung wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Li et al (2005) mit dem Programm pymol (Delano scientific LLC) erstellt

Die Cysteine 413 und 500 sind in den Spezies Mensch, Hund und Maus konserviert, kommen in Hühner-Occludin jedoch nicht vor (Ando-Akatsuka et al. 1996). Um den Einfluss der Cysteine auf die Oligomerisierung weiter zu untersuchen, wäre eine Wiederholung der FRET-Experimente sowie der *in vitro* Untersuchungen mit Hühner-Occludin interessant.

#### 4.3.1 Physiologische Bedeutung der Dimerisierung von Occludin

Im Zytosol liegt ein reduzierendes Milieu vor. Trotzdem wurden einige Proteine mit Disulfidbrücken im Zytosol beschrieben (Cumming et al. 2004; Cedervall et al. 2005; Mishra et al. 2007). Die Interaktion über Disulfidbrücken ist vom Redoxstatus der Zelle abhängig. Den Hauptbestandteil des zytosolischen Redox-Puffersystems stellt das niedermolekulare Thiol Glutathion dar. Das Redox-Puffersystem im Zytosol unterliegt Schwankungen. Oxidativer Stress (Reed et al. 2008) und Alterung (Zhu et al. 2006) senken die Konzentration von reduziertem Glutathion im Zytosol. Es können sich verschiedene disulfidverlinkte Proteinkomplexe (Brennan et al. 2004; Cumming et al. 2004) formen. Occludin ist ein Zielmolekül für oxidativen Stress (Maier et al. 2006). Eine Studie zu den Auswirkungen von oxidativem



## Diskussion

Stress auf Occludin zeigte eine Abkehr von den TJ und vermehrten Abbau des Proteins (Bailey et al. 2004). Bei Hypoxie, die während Ischämie und bei Schlaganfall auftritt und zu oxidativem Stress führt, wird Occludin in zerebralen Endothelzellen herunterreguliert (Krizbai et al. 2005). Die Bedeutung des C-Terminus von Occludin für die Integrität der TJ wurde von Balda et al. demonstriert (Balda et al. 1996b). Sie zeigten, dass die Transfektion von Occludinmutanten ohne intrazellulären Teil zu einer Öffnung der TJ führte. Diese Befunde deuten auf eine regulatorische Bedeutung der Dimerisierung des Occ C unter pathologischen Bedingungen hin, die zur Öffnung der TJ führen kann.

## 5 Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke bildet eine essenzielle Barriere zwischen dem Gehirn und dem Blutkreislauf, die die Homöostase im Gehirn aufrecht erhält. Funktionelle Grundlage dieser Barriere sind die Endothelzellen. Endothelzellen bilden an der lateralen Seite der Plasmamembranen Zellkontakte zur Nachbarzelle aus. Man unterscheidet drei verschiedene Zellkontakte in Endothelzellen, die *tight junctions* (TJ), *adherens junction* und *gap junction*. Die TJ befinden sich am Übergang zwischen dem lateralen und apikalen Bereich der Plasmamembran. Sie schränken die parazelluläre Passage von wasserlöslichen Molekülen stark ein.

Durch pathologische Veränderungen kann es zur Öffnung der TJ mit schwerwiegenden Folgen für die Homöostase des Gehirns kommen. Bei Erkrankungen des Gehirns verhindern intakte TJ die Aufnahme von wasserlöslichen Medikamenten. Für therapeutische Zwecke ist es daher wünschenswert, die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke gezielt zu manipulieren. Die Manipulation der Zellkontakte setzt eine genaue Kenntnis der beteiligten Proteine, ihrer Interaktionspartner, ihrer Funktion und Regulation voraus. Teilaspekte sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Die TJ-Proteine Zonula Occludens-1 (ZO-1) und Occludin haben einen Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität der TJ. In einem bioinformatischen Modell wurde die Hypothese aufgestellt, dass ZO-1 und Occludin über helikale Wechselwirkungen miteinander interagieren und dass für diese Interaktion eine Oligomerisierung von ZO-1 und Occludin erforderlich ist. Als Interaktionsareale wurden die C-terminalen 123 Aminosäuren inklusive der *coiled-coil*-Domäne von Occludin (Occ C) und die SH3-hinge-GuK-Einheit von ZO-1 identifiziert (Muller et al. 2005). Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, die im Modell beschriebenen Selbstinteraktionen von ZO-1 und Occ C sowie die Interaktion zwischen den beiden Proteinen *in vitro* zu untersuchen. Die Selbstinteraktion des Occ C wurde mit Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und Größenausschlusschromatografie bestätigt. Mit Lichtstreuungsuntersuchungen wurde gezeigt, dass es sich bei den Oligomeren um Dimere handelt. Durch chemische Blockierung der Cysteine im Occ C konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Interaktion auf Disulfidbrücken beruht. Die Selbstinteraktion war durch Glutathion in physiologischen Konzentrationen beeinflussbar. Verringerte Glutathionkonzentrationen treten in der Zelle bei oxidativem Stress auf. Oxidativer Stress ist eine Folge von Schlaganfall und Ischämie. Beide Erkrankungen stehen in Zusammenhang mit einer geöffneten Blut-Hirn-Schranke. Zelluläre Studien zur Dimerisierung von Occludin unter Hypoxie sollen die Rolle von Occludin bei oxidativem Stress aufklären. Entsprechende Untersuchungen von Occludin nach hypoxischer sowie posthypoxischer Schädigung sind aufgenommen worden. Eine Selbstinteraktion der SH3-hinge-GuK-Einheit von ZO-1 sowie einzelner Domänen dieser Einheit konnte *in vitro* ebenfalls mit Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, Größenausschlusschromatografie und Lichtstreuungsuntersuchungen nachgewiesen werden. Die Interaktion von zwei  $\alpha$ -helikalen Peptiden aus ZO-1 mit Occ C wurde mit Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie gezeigt. Mit zirkularer Dichroismus-Spektroskopie konnte die  $\alpha$ -helikale Struktur des Occ C nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse untermauern die Annahme aus dem Modell, dass es sich bei der Interaktion von ZO-1 und Occludin um helikale Wechselwirkungen handelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde nach Proteinen gesucht, die am Aufbau oder der Regulation der Zellkontakte beteiligt sind. Ausgangspunkt waren die PDZ-Domänen eins und zwei aus ZO-1. Diese

## Zusammenfassung

Domänen binden an Membranproteine der Zellkontakte, z. B. an Mitglieder der Claudin-Familie, die für den Verschluss des parazellulären Spaltes unabdingbar sind. Die Interaktionen zwischen ZO-1 und Membranproteinen wirken sich auf deren Lokalisation an den Zellkontakten aus und eröffnen somit eine Möglichkeit zur Beeinflussung der parazellulären Permeabilität. Zur Identifizierung von neuen Bindungspartnern wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Bindungspartner in einer humanen Peptidbibliothek identifiziert. Auf diese Weise konnten knapp hundert Proteine als Bindungspartner für die PDZ-Domänen eins und zwei von ZO-1 nachgewiesen werden. Zum anderen wurde aus einem Zelllysate von Rattenepithelzellen ca. 650 Proteine in einem *pull-down*-Experiment identifiziert. Ein Vergleich der Proteine aus den beiden methodisch unterschiedlichen Versuchsreihen erbrachte eine Interaktion der PDZ 2-Domäne mit den Proteinphosphatasen 2A und 4. Die Phosphatase 2A dephosphoryliert TJ-Proteine und reguliert so die parazelluläre Permeabilität. Damit wurde eine neue Funktion von ZO-1 als Rekrutierungsprotein von Phosphatasen aufgezeigt.

Eine Phosphorylierung der PDZ-Domänen von ZO-1 und ihre Auswirkung auf die Bindung an Membranproteine der Zellkontakte konnte mit rekombinanten Proteinen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der PDZ-Domänen durch die Proteinkinase C  $\alpha$  wurde an Threonin 109 und Serin 208 nachgewiesen. Durch Austausch von Threoninen in den PDZ-Domänen gegen Glutamat wurden Phosphorylierungen durch Einfügen einer negativen Ladung imitiert. Die Mutanten wurden in ihrem Bindungsverhalten an 51 ausgewählte Membranproteine mit den PDZ-Domänen verglichen. Die PDZ 1-Domäne zeigte eine Bindung an Claudin 2, 8, 10, 14, 15 und 17. Auf diese Weise wurde Claudin 15 zum ersten Mal als Interaktionspartner der PDZ 1-Domäne *in vitro* identifiziert. Die Mutante mit Glutamat statt Threonin in Position 109 band an Claudin 2,8,10,12 und 14. Sie zeigte damit ein sehr ähnliches Bindungsmuster. Die PDZ 2-Domäne band an die *gap junction* Proteine Connexin 43 und 45 sowie die TJ-Proteine *junctional adhesion* Moleküle (JAM) B und C. Eine Mutante der PDZ 2-Domäne mit Glutamat anstelle von Threonin in Position 247 band nur noch an JAM C. Eine weitere Mutante mit Austausch in Position 251 band an keinen C-Terminus mehr. Die Ergebnisse weisen einen vielversprechenden Weg, die Interaktion von ZO-1 mit Membranproteinen zu beeinflussen.

Die experimentellen Befunde dieser Arbeit tragen zum Verständnis der Organisation und Regulation der TJ bei. Sie liefern durch das Auffinden verschiedener Schlüsselproteine die Voraussetzung für die Entwicklung von Effektoren, die zu einer pharmakologischen Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke beitragen können.

## 6 Summary

The blood brain barrier establishes an essential barrier between blood and the brain, which accounts for the homeostasis of the brain. Functional basis of this barrier are endothelial cells. Endothelial cells build cell contacts to neighboring cells at the lateral part of the membrane. One can distinguish three types of cell contacts, tight junctions, adherens junction and gap junction. Tight junctions (TJ) are formed at the lateral sites of the cell, and limit the paracellular passage of molecules.

Pathological changes can lead to open TJ with serious consequences for the maintenance of brain homeostasis. Intact TJ avoid the uptake of hydrophilic drugs into the brain. For therapeutic purposes it is often desirable to change the permeability of the blood brain barrier, and tight junctions are suitable targets for such drugs. To manipulate the blood brain barrier it is conducive to study the proteins involved, their interaction partners, their function and regulation in detail.

The zonula occludens protein-1 (ZO-1) and occludin have an impact on the tightness of the TJs. A molecular association model predicts the interaction between ZO-1 and occludin via the SH3-hinge-GuK unit of ZO-1 and the C-terminal 123 amino acids of occludin (Occ C), which include a coiled-coil domain. The model suggests that the proteins interact through helices. Furthermore, this interaction requires the oligomerisation of each binding partner (Müller et al. 2005). In the presented work, the self-interaction of Occ C and ZO-1, as well as the interaction between them, was investigated in vitro. The self-interaction of Occ C was verified by surface plasmon resonance spectroscopy and size-exclusion chromatography. Light scattering revealed that these oligomers were dimers. By chemical modification of cysteines, it was shown that the interaction was due to disulfide bridges. The binding was abrogated by reduced glutathione at physiological concentrations. Decreased glutathione levels in the cell are caused by oxidative stress. Oxidative stress occurs after stroke and ischemia. Both diseases cause an open blood brain barrier. Investigations on the dimerization of occludin in living cells under hypoxic and posthypoxic conditions are currently underway. The self association of the SH3-hinge-GuK unit and parts of the unit was shown by surface plasmon resonance spectroscopy, size exclusion chromatography and light scattering. The interaction between two  $\alpha$ -helical peptides of ZO-1 and Occ C was shown by surface plasmon resonance spectroscopy. Circular dichroism spectroscopy revealed an  $\alpha$ -helical structure. This confirms the hypothesis that ZO-1 SH3-hinge-GuK unit and Occ C interact through helical forces.

In the second part of this thesis, a search was conducted for proteins that may be involved in establishing or regulating cell contacts. PDZ domains of the ZO-1 protein bind to membrane proteins at cell contacts formed by proteins of the claudin family. Claudins are crucial for closing the paracellular cleft. The interaction between ZO-1 and membrane proteins affects their localisation at cell contacts and thus might be used to influence the paracellular permeability. To identify new proteins that may be involved in cell contacts, a peptide library and epithelial cell lysates were screened with PDZ domains one and two of ZO-1. The peptide library showed approximately one hundred binding partners for each PDZ domain. In a pull-down assay of epithelial cell lysate, about 650 different proteins were identified by mass spectroscopy. The proteins identified with two independent methods were compared. Eleven proteins were found in both experiments: among them the two phosphatases 2A and 4. For Phosphatase 2A, it is known that it dephosphorylates tj proteins and in this way regulates paracellular permeability. Hence, a new function for ZO-1 as recruiting

## Summary

protein for phosphatases was shown.

Phosphorylation of the PDZ domains of ZO-1, and its consequences for the binding of membrane proteins involved in cell contacts could be shown for recombinant proteins. PDZ phosphorylation at threonine 109 and serine 208 by protein kinase C $\alpha$  was proven in vitro. Phosphorylation was mimicked by site-specific mutagenesis of threonines to glutamate in PDZ domains one and two. The mutants were compared with the wild type with respect to their ability to bind 51 membrane proteins of the junctional complex. The PDZ 1-Domain of ZO-1 showed binding to claudins 2, 8, 10, 14, 15 and 17. Claudin 15 was identified as a binding partner for ZO-1 PDZ 1 for the first time in vitro. The mutant T109E showed a slightly different binding pattern. It bound claudin 2, 8, 10, 12 and 14. PDZ 2 of ZO-1 interacted with Connexin 43 and 45, as well as junctional adhesion molecules (JAM) B and C. A glutamate mutant in position 247 only showed binding to JAM C. Another mutant with glutamate at position 251 did not bind to any ligand. These results open a promising opportunity to influence the interaction of ZO-1 with membrane proteins.

In this thesis, a substantial contribution to the understanding of interactions and regulation processes at tj was made by identifying phosphatases 2A and 4 as bindingpartners of ZO-1 and phosphorylation sites which influence ligand binding. The identification of key proteins is a prerequisite for the development of effectors which can lead to pharmacological treatment of the blood-brain barrier.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. (2002): Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability, *J.Anat.* (Band 200), Nr. 5, Seite 527. URL: PM:17103724
- Adachi, M.; Inoko, A.; Hata, M.; Furuse, K.; Umeda, K.; Itoh, M. und Tsukita, S. (2006): Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein, *Mol.Cell Biol.* (Band 26), Nr. 23, Seite 9003-9015. URL: PM:17000770
- Anderson, J. M. (1996): Cell signalling: MAGUK magic, *Curr.Biol.* (Band 6), Nr. 4, Seite 382-384. URL: PM:8723338
- Anderson, J. M.; Stevenson, B. R.; Jesaitis, L. A.; Goodenough, D. A. und Mooseker, M. S. (1988): Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells, *J.Cell Biol.* (Band 106), Nr. 4, Seite 1141-1149. URL: PM:2452168
- Anderson, J. M.; Van Itallie, C. M.; Peterson, M. D.; Stevenson, B. R.; Carew, E. A. und Mooseker, M. S. (1989): ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells, *J.Cell Biol.* (Band 109), Nr. 3, Seite 1047-1056. URL: PM:2670954
- Ando-Akatsuka, Y.; Saitou, M.; Hirase, T.; Kishi, M.; Sakakibara, A.; Itoh, M.; Yonemura, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (1996): Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues, *J.Cell Biol.* (Band 133), Nr. 1, Seite 43-47. URL: PM:8601611
- Andreeva, A. Y.; Krause, E.; Muller, E. C.; Blasig, I. E. und Utepbergenov, D. I. (2001): Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 42, Seite 38480-38486. URL: PM:11502742
- Andreeva, A. Y.; Piontek, J.; Blasig, I. E. und Utepbergenov, D. I. (2006): Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms, *Int.J.Biochem.Cell Biol.* (Band 38), Nr. 2, Seite 222-233. URL: PM:16257565
- Angelow, S.; Ahlstrom, R. und Yu, A. S. (2008): Biology of Claudins, *Am.J.Physiol Renal Physiol.* URL: PM:18480174
- Appleton, B. A.; Zhang, Y.; Wu, P.; Yin, J. P.; Hunziker, W.; Skelton, N. J.; Sidhu, S. S. und Wiesmann, C. (2006): Comparative structural analysis of the Erbin PDZ domain and the first PDZ domain of ZO-1. Insights into determinants of PDZ domain specificity, *J.Biol.Chem.* (Band 281), Nr. 31, Seite 22312-22320. URL: PM:16737969
- Asano, K.; Kinzy, T. G.; Merrick, W. C. und Hershey, J. W. (1997): Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 2, Seite 1101-1109. URL: PM:8995409
- Assemat, E.; Bazellieres, E.; Pallesi-Pocachard, E.; Le Bivic, A. und Massey-Harroche, D. (2008): Polarity complex proteins, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 614-630. URL: PM:18005931
- Ausubel, F. A.; Brent, R. F. Kingston; D.D.Moore; J.G.Seidman; J.A.Smidt und K.Struh(eds.) (2002): *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York.
- Avila-Flores, A.; Rendon-Huerta, E.; Moreno, J.; Islas, S.; Betanzos, A.; Robles-Flores, M. und Gonzalez-Mariscal, L. (2001): Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C, *Biochem.J.* (Band 360), Nr. Pt 2, Seite 295-304. URL: PM:11716757
- Bailey, T. A.; Kanuga, N.; Romero, I. A.; Greenwood, J.; Luthert, P. J. und Cheetham, M. E. (2004): Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* (Band 45), Nr. 2, Seite 675-684. URL: PM:14744914
- Balda, M. S. und Anderson, J. M. (1993): Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms, *Am.J.Physiol* (Band 264), Nr. 4 Pt 1, Seite C918-C924. URL: PM:7682777
- Balda, M. S.; Anderson, J. M. und Matter, K. (1996a): The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain, *FEBS Lett.* (Band 399), Nr. 3, Seite 326-332. URL: PM:8985173

## Literaturverzeichnis

- Balda, M. S.; Garrett, M. D. und Matter, K. (2003): The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density, *J.Cell Biol.* (Band 160), Nr. 3, Seite 423-432. URL: PM:12566432
- Balda, M. S.; Gonzalez-Mariscal, L.; Matter, K.; Cerejido, M. und Anderson, J. M. (1993): Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol, *J.Cell Biol.* (Band 123), Nr. 2, Seite 293-302. URL: PM:8408213
- Balda, M. S. und Matter, K. (2000): The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression, *EMBO J.* (Band 19), Nr. 9, Seite 2024-2033. URL: PM:10790369
- Balda, M. S.; Whitney, J. A.; Flores, C.; Gonzalez, S.; Cerejido, M. und Matter, K. (1996b): Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein, *J.Cell Biol.* (Band 134), Nr. 4, Seite 1031-1049. URL: PM:8769425
- Ballabh, P.; Braun, A. und Nedergaard, M. (2004): The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications, *Neurobiol.Dis.* (Band 16), Nr. 1, Seite 1-13. URL: PM:15207256
- Bazzoni, G. und Dejana, E. (2004): Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis, *Physiol Rev.* (Band 84), Nr. 3, Seite 869-901. URL: PM:15269339
- Bazzoni, G.; Martinez-Estrada, O. M.; Orsenigo, F.; Cordenonsi, M.; Citi, S. und Dejana, E. (2000): Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 27, Seite 20520-20526. URL: PM:10877843
- Betanzos, A.; Huerta, M.; Lopez-Bayghen, E.; Azuara, E.; Amerena, J. und Gonzalez-Mariscal, L. (2004): The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells, *Exp.Cell Res.* (Band 292), Nr. 1, Seite 51-66. URL: PM:14720506
- Blasig, I. E.; Winkler, L.; Lassowski, B.; Mueller, S. L.; Zuleger, N.; Krause, E.; Krause, G.; Gast, K.; Kolbe, M. und Piontek, J. (2006): On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins, *Cell Mol.Life Sci.* (Band 63), Nr. 4, Seite 505-514. URL: PM:16456617
- Blom, N.; Gammeltoft, S. und Brunak, S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *J.Mol.Biol.* (Band 294), Nr. 5, Seite 1351-1362. URL: PM:10600390
- Blom, N.; Sicheritz-Ponten, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S. und Brunak, S. (2004): Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence, *Proteomics.* (Band 4), Nr. 6, Seite 1633-1649. URL: PM:15174133
- Boisguerin, P.; Leben, R.; Ay, B.; Radziwill, G.; Moelling, K.; Dong, L. und Volkmer-Engert, R. (2004): An improved method for the synthesis of cellulose membrane-bound peptides with free C termini is useful for PDZ domain binding studies, *Chem.Biol.* (Band 11), Nr. 4, Seite 449-459. URL: PM:15123239
- Bouvier, D.; Kieken, F.; Kellezi, A. und Sorgen, P. L. (2008): Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin 40 caused by the interaction with c-Src and zonula occludens-1, *Cell Commun.Adhes.* (Band 15), Nr. 1, Seite 107-118. URL: PM:18649183
- Brennan, J. P.; Wait, R.; Begum, S.; Bell, J. R.; Dunn, M. J. und Eaton, P. (2004): Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 40, Seite 41352-41360. URL: PM:15292244
- Cario, E.; Gerken, G. und Podolsky, D. K. (2004): Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C, *Gastroenterology* (Band 127), Nr. 1, Seite 224-238. URL: PM:15236188
- Cedervall, T.; Berggard, T.; Borek, V.; Thulin, E.; Linse, S. und Akerfeldt, K. S. (2005): Redox sensitive cysteine residues in calbindin D28k are structurally and functionally important, *Biochemistry* (Band 44), Nr. 2, Seite 684-693. URL: PM:15641794
- Chen, V. C.; Li, X.; Perreault, H. und Nagy, J. I. (2006): Interaction of zonula occludens-1 (ZO-1) with alpha-actinin-4: application of functional proteomics for identification of PDZ domain-associated proteins, *J.Proteome.Res.* (Band 5), Nr. 9, Seite 2123-2134. URL: PM:16944923
- Chen, Y. H.; Lu, Q.; Goodenough, D. A. und Jeansonne, B. (2002): Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells, *Mol.Biol.Cell*

## Literaturverzeichnis

(Band 13), Nr. 4, Seite 1227-1237. URL: PM:11950934

Chen, Y. H.; Yang, J. T. und Martinez, H. M. (1972): Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion, *Biochemistry* (Band 11), Nr. 22, Seite 4120-4131. URL: PM:4343790

Chiba, H.; Osanai, M.; Murata, M.; Kojima, T. und Sawada, N. (2008): Transmembrane proteins of tight junctions, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 588-600. URL: PM:17916321

Cohen, C. J.; Shieh, J. T.; Pickles, R. J.; Okegawa, T.; Hsieh, J. T. und Bergelson, J. M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 98), Nr. 26, Seite 15191-15196. URL: PM:11734628

Cohen, P. T.; Philp, A. und Vazquez-Martin, C. (2005): Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions, *FEBS Lett.* (Band 579), Nr. 15, Seite 3278-3286. URL: PM:15913612

Colegio, O. R.; Van Itallie, C.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2003): Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture, *Am.J.Physiol Cell Physiol* (Band 284), Nr. 6, Seite C1346-C1354. URL: PM:12700140

Cordenonsi, M.; D'Atri, F.; Hammar, E.; Parry, D. A.; Kendrick-Jones, J.; Shore, D. und Citi, S. (1999): Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 7, Seite 1569-1582. URL: PM:10613913

Cumming, R. C.; Andon, N. L.; Haynes, P. A.; Park, M.; Fischer, W. H. und Schubert, D. (2004): Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 21, Seite 21749-21758. URL: PM:15031298

D'Atri, F. und Citi, S. (2001): Cingulin interacts with F-actin in vitro, *FEBS Lett.* (Band 507), Nr. 1, Seite 21-24. URL: PM:11682052

D'Atri, F.; Nadalutti, F. und Citi, S. (2002): Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells, *J.Biol.Chem.* (Band 277), Nr. 31, Seite 27757-27764. URL: PM:12023291

Dragsten, P. R.; Blumenthal, R. und Handler, J. S. (1981): Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane?, *Nature* (Band 294), Nr. 5843, Seite 718-722. URL: PM:7322203

Ebnet, K.; Aurrand-Lions, M.; Kuhn, A.; Kiefer, F.; Butz, S.; Zander, K.; Meyer Zu Brickwedde, M. K.; Suzuki, A.; Imhof, B. A. und Vestweber, D. (2003): The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity, *J.Cell Sci.* (Band 116), Nr. Pt 19, Seite 3879-3891. URL: PM:12953056

Ebnet, K.; Schulz, C. U.; Meyer Zu Brickwedde, M. K.; Pendl, G. G. und Vestweber, D. (2000): Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 36, Seite 27979-27988. URL: PM:10856295

Ebnet, K.; Suzuki, A.; Horikoshi, Y.; Hirose, T.; Meyer Zu Brickwedde, M. K.; Ohno, S. und Vestweber, D. (2001): The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM), *EMBO J.* (Band 20), Nr. 14, Seite 3738-3748. URL: PM:11447115

Eckert, J. J.; McCallum, A.; Mears, A.; Rumsby, M. G.; Cameron, I. T. und Fleming, T. P. (2004): Specific PKC isoforms regulate blastocoel formation during mouse preimplantation development, *Dev.Biol.* (Band 274), Nr. 2, Seite 384-401. URL: PM:15385166

Etournay, R.; Zwaenepoel, I.; Perfettini, I.; Legrain, P.; Petit, C. und El Amraoui, A. (2007): Shroom2, a myosin-VIIa- and actin-binding protein, directly interacts with ZO-1 at tight junctions, *J.Cell Sci.* (Band 120), Nr. Pt 16, Seite 2838-2850. URL: PM:17666436

Fanning, A. S.; Jameson, B. J.; Jesaitis, L. A. und Anderson, J. M. (1998): The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton, *J.Biol.Chem.* (Band 273), Nr. 45, Seite 29745-29753. URL: PM:9792688

Fanning, A. S.; Little, B. P.; Rahner, C.; Utepbergenov, D.; Walther, Z. und Anderson, J. M. (2007a): The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties, *Mol.Biol.Cell* (Band 18), Nr. 3, Seite 721-731. URL: PM:17182847

Fanning, A. S.; Lye, M. F.; Anderson, J. M. und Lavie, A. (2007b): Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 52, Seite 37710-37716. URL: PM:17928286



- Fanning, A. S.; Ma, T. Y. und Anderson, J. M. (2002): Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1, *FASEB J.* (Band 16), Nr. 13, Seite 1835-1837. URL: PM:12354695
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E. (1963): Junctional complexes in various epithelia, *J.Cell Biol.* (Band 17), Seite 375-412. URL: PM:13944428
- Fleming, T. P.; McConnell, J.; Johnson, M. H. und Stevenson, B. R. (1989): Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1, *J.Cell Biol.* (Band 108), Nr. 4, Seite 1407-1418. URL: PM:2647768
- Fujibe, M.; Chiba, H.; Kojima, T.; Soma, T.; Wada, T.; Yamashita, T. und Sawada, N. (2004): Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions, *Exp.Cell Res.* (Band 295), Nr. 1, Seite 36-47. URL: PM:15051488
- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993): Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 123), Nr. 6 Pt 2, Seite 1777-1788. URL: PM:8276896
- Furuse, M.; Itoh, M.; Hirase, T.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1994): Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 127), Nr. 6 Pt 1, Seite 1617-1626. URL: PM:7798316
- Furuse, M.; Sasaki, H.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998): A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts, *J.Cell Biol.* (Band 143), Nr. 2, Seite 391-401. URL: PM:9786950
- Furuse, M. und Tsukita, S. (2006): Claudins in occluding junctions of humans and flies, *Trends Cell Biol.* (Band 16), Nr. 4, Seite 181-188. URL: PM:16537104
- Gagell, C. (2008): Investigations of the homo-interaction of the tight junction protein ZO-1 in living cells, Fachhochschule Lausitz, Germany.
- Garavito, R. M. und Ferguson-Miller, S. (2001): Detergents as tools in membrane biochemistry, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 35, Seite 32403-32406. URL: PM:11432878
- Gast, K. und Modler, A. J. (2005): Studying protein folding and aggregation by laser light scattering., Buchner, J. und Kiefhaber, T., *Protein Folding Handbook*, Part 1. Auflage, Seite 673-709, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Giepmans, B. N. (2004): Gap junctions and connexin-interacting proteins, *Cardiovasc.Res.* (Band 62), Nr. 2, Seite 233-245. URL: PM:15094344
- Gonzalez-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P. und Jaramillo, B. E. (2003): Tight junction proteins, *Prog.Biophys.Mol.Biol.* (Band 81), Nr. 1, Seite 1-44. URL: PM:12475568
- Gonzalez-Mariscal, L.; Islas, S.; Contreras, R. G.; Garcia-Villegas, M. R.; Betanzos, A.; Vega, J.; Diaz-Quinonez, A.; Martin-Orozco, N.; Ortiz-Navarrete, V.; Cerejido, M. und Valdes, J. (1999): Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells, *Exp.Cell Res.* (Band 248), Nr. 1, Seite 97-109. URL: PM:10094817
- Gonzalez-Mariscal, L.; Tapia, R. und Chamorro, D. (2008): Crosstalk of tight junction components with signaling pathways, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 729-756. URL: PM:17950242
- Gottardi, C. J.; Arpin, M.; Fanning, A. S. und 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.U.S.A* (Band 93), Nr. 20, Seite 10779-10784. URL: PM:8855257
- Gumbiner, B.; Lowenkopf, T. und Apatira, D. (1991): Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 88), Nr. 8, Seite 3460-3464. URL: PM:2014265
- Harris, B. Z. und Lim, W. A. (2001): Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly, *J.Cell Sci.* (Band 114), Nr. Pt 18, Seite 3219-3231. URL: PM:11591811
- Haskins, J.; Gu, L.; Wittchen, E. S.; Hibbard, J. und Stevenson, B. R. (1998): ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin, *J.Cell Biol.* (Band 141), Nr. 1, Seite 199-208. URL: PM:9531559
- Hernandez, S.; Chavez, Munguia B. und Gonzalez-Mariscal, L. (2007): ZO-2 silencing in epithelial

- cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture, *Exp.Cell Res.* (Band 313), Nr. 8, Seite 1533-1547. URL: PM:17374535
- Hsueh, Y. P.; Wang, T. F.; Yang, F. C. und Sheng, M. (2000): Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2, *Nature* (Band 404), Nr. 6775, Seite 298-302. URL: PM:10749215
- Huerta, M.; Munoz, R.; Tapia, R.; Soto-Reyes, E.; Ramirez, L.; Recillas-Targa, F.; Gonzalez-Mariscal, L. und Lopez-Bayghen, E. (2007): Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc, *Mol.Biol.Cell* (Band 18), Nr. 12, Seite 4826-4836. URL: PM:17881732
- Ikari, A.; Hirai, N.; Shiroma, M.; Harada, H.; Sakai, H.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Degawa, M. und Takagi, K. (2004): Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 52, Seite 54826-54832. URL: PM:15496416
- Ikenouchi, J.; Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (2005): Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 171), Nr. 6, Seite 939-945. URL: PM:16365161
- Ikenouchi, J.; Umeda, K.; Tsukita, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2007): Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization, *J.Cell Biol.* (Band 176), Nr. 6, Seite 779-786. URL: PM:17353356
- Inoko, A.; Itoh, M.; Tamura, A.; Matsuda, M.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2003): Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues, *Genes Cells* (Band 8), Nr. 11, Seite 837-845. URL: PM:14622136
- Ishizaki, T.; Chiba, H.; Kojima, T.; Fujibe, M.; Soma, T.; Miyajima, H.; Nagasawa, K.; Wada, I. und Sawada, N. (2003): Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways, *Exp.Cell Res.* (Band 290), Nr. 2, Seite 275-288. URL: PM:14567987
- Islas, S.; Vega, J.; Ponce, L. und Gonzalez-Mariscal, L. (2002): Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells, *Exp.Cell Res.* (Band 274), Nr. 1, Seite 138-148. URL: PM:11855865
- Itoh, M.; Furuse, M.; Morita, K.; Kubota, K.; Saitou, M. und Tsukita, S. (1999a): Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 6, Seite 1351-1363. URL: PM:10601346
- Itoh, M.; Morita, K. und Tsukita, S. (1999b): Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 9, Seite 5981-5986. URL: PM:10026224
- Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Moroi, S. und Tsukita, S. (1997): Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments, *J.Cell Biol.* (Band 138), Nr. 1, Seite 181-192. URL: PM:9214391
- Itoh, M.; Sasaki, H.; Furuse, M.; Ozaki, H.; Kita, T. und Tsukita, S. (2001): Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 154), Nr. 3, Seite 491-497. URL: PM:11489913
- Jemth, P. und Gianni, S. (2007): PDZ domains: folding and binding, *Biochemistry* (Band 46), Nr. 30, Seite 8701-8708. URL: PM:17620015
- Jesaitis, L. A. und Goodenough, D. A. (1994): Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein, *J.Cell Biol.* (Band 124), Nr. 6, Seite 949-961. URL: PM:8132716
- Karpova, T. S.; Baumann, C. T.; He, L.; Wu, X.; Grammer, A.; Lipsky, P.; Hager, G. L. und McNally, J. G. (2003): Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser, *J.Microsc.* (Band 209), Nr. Pt 1, Seite 56-70. URL: PM:12535185
- Katsube, T.; Takahisa, M.; Ueda, R.; Hashimoto, N.; Kobayashi, M. und Togashi, S. (1998): Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse, *J.Biol.Chem.* (Band 273), Nr. 45, Seite 29672-29677. URL: PM:9792678
- Kausalya, P. J.; Phua, D. C. und Hunziker, W. (2004): Association of ARVCF with zonula occludens

## Literaturverzeichnis

- (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF, *Mol.Biol.Cell* (Band 15), Nr. 12, Seite 5503-5515. URL: PM:15456900
- Kim, E.; Naisbitt, S.; Hsueh, Y. P.; Rao, A.; Rothschild, A.; Craig, A. M. und Sheng, M. (1997): GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules, *J.Cell Biol.* (Band 136), Nr. 3, Seite 669-678. URL: PM:9024696
- Kobayashi, J.; Inai, T. und Shibata, Y. (2002): Formation of tight junction strands by expression of claudin-1 mutants in their ZO-1 binding site in MDCK cells, *Histochem.Cell Biol.* (Band 117), Nr. 1, Seite 29-39. URL: PM:11819095
- Kolch, W. (2003): Erbin: sorting out ErbB2 receptors or giving Ras a break?, *Sci.STKE.* (Band 2003), Nr. 199, Seite e37. URL: PM:12966186
- Kosower, N. S. und Kosower, E. M. (1978): The glutathione status of cells, *Int.Rev.Cytol.* (Band 54), Seite 109-160. URL: PM:42630
- Krause, G.; Winkler, L.; Mueller, S. L.; Haseloff, R. F.; Piontek, J. und Blasig, I. E. (2008): Structure and function of claudins, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 631-645. URL: PM:18036336
- Krizbai, I. A.; Bauer, H.; Bresgen, N.; Eckl, P. M.; Farkas, A.; Szatmari, E.; Traweger, A.; Wejksza, K. und Bauer, H. C. (2005): Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells, *Cell Mol.Neurobiol.* (Band 25), Nr. 1, Seite 129-139. URL: PM:15962510
- Kurihara, H.; Anderson, J. M. und Farquhar, M. G. (1992): Diversity among tight junctions in rat kidney: glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction protein ZO-1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 89), Nr. 15, Seite 7075-7079. URL: PM:1496002
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J.Mol.Biol.* (Band 157), Nr. 1, Seite 105-132. URL: PM:7108955
- Lacaz-Vieira, F.; Jaeger, M. M.; Farshori, P. und Kachar, B. (1999): Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing, *J.Membr.Biol.* (Band 168), Nr. 3, Seite 289-297. URL: PM:10191363
- Li, X.; Olson, C.; Lu, S.; Kamasawa, N.; Yasumura, T.; Rash, J. E. und Nagy, J. I. (2004): Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1, *Eur.J.Neurosci.* (Band 19), Nr. 8, Seite 2132-2146. URL: PM:15090040
- Li, Y.; Fanning, A. S.; Anderson, J. M. und Lavie, A. (2005): Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface, *J.Mol.Biol.* (Band 352), Nr. 1, Seite 151-164. URL: PM:16081103
- Liu, Y.; Nusrat, A.; Schnell, F. J.; Reaves, T. A.; Walsh, S.; Pochet, M. und Parkos, C. A. (2000): Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia, *J.Cell Sci.* (Band 113 ( Pt 13)), Seite 2363-2374. URL: PM:10852816
- Maier, C. M.; Hsieh, L.; Crandall, T.; Narasimhan, P. und Chan, P. H. (2006): A new approach for the investigation of reperfusion-related brain injury, *Biochem.Soc.Trans.* (Band 34), Nr. Pt 6, Seite 1366-1369. URL: PM:17073820
- Mandel, L. J.; Bacallao, R. und Zampighi, G. (1993): Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions, *Nature* (Band 361), Nr. 6412, Seite 552-555. URL: PM:8429911
- Mandell, K. J.; Babbitt, B. A.; Nusrat, A. und Parkos, C. A. (2005): Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 12, Seite 11665-11674. URL: PM:15677455
- Mann, M. (2006): Functional and quantitative proteomics using SILAC, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* (Band 7), Nr. 12, Seite 952-958. URL: PM:17139335
- Martin-Granados, C.; Philp, A.; Oxenham, S. K.; Prescott, A. R. und Cohen, P. T. (2008): Depletion of protein phosphatase 4 in human cells reveals essential roles in centrosome maturation, cell migration and the regulation of Rho GTPases, *Int.J.Biochem.Cell Biol.* URL: PM:18487071

## Literaturverzeichnis

- Martin-Padura, I.; Lostaglio, S.; Schneemann, M.; Williams, L.; Romano, M.; Fruscella, P.; Panzeri, C.; Stoppacciaro, A.; Ruco, L.; Villa, A.; Simmons, D. und Dejana, E. (1998): Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration, *J.Cell Biol.* (Band 142), Nr. 1, Seite 117-127. URL: PM:9660867
- McGee, A. W.; Dakoji, S. R.; Olsen, O.; Bredt, D. S.; Lim, W. A. und Prehoda, K. E. (2001): Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins, *Mol.Cell* (Band 8), Nr. 6, Seite 1291-1301. URL: PM:11779504
- McNeil, E.; Capaldo, C. T. und Macara, I. G. (2006): Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells, *Mol.Biol.Cell* (Band 17), Nr. 4, Seite 1922-1932. URL: PM:16436508
- Mishra, P.; Socolich, M.; Wall, M. A.; Graves, J.; Wang, Z. und Ranganathan, R. (2007): Dynamic scaffolding in a G protein-coupled signaling system, *Cell* (Band 131), Nr. 1, Seite 80-92. URL: PM:17923089
- Morita, K.; Sasaki, H.; Furuse, M. und Tsukita, S. (1999): Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 1, Seite 185-194. URL: PM:10508865
- Muhleisen, H.; Fingerle, J.; Wolburg, H. und Betz, E. (1989): Structural alterations in vascular endothelial tight junctions in the course of their gradual degradation in vitro, *Tissue Cell* (Band 21), Nr. 6, Seite 803-811. URL: PM:2629163
- Muller, D.; Kausalya, P. J.; Claverie-Martin, F.; Meij, I. C.; Eggert, P.; Garcia-Nieto, V. und Hunziker, W. (2003): A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 73), Nr. 6, Seite 1293-1301. URL: PM:14628289
- Muller, S. L.; Portwich, M.; Schmidt, A.; Utebbergenov, D. I.; Huber, O.; Blasig, I. E. und Krause, G. (2005): The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 5, Seite 3747-3756. URL: PM:15548514
- Muresan, Z.; Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (2000): Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin, *Mol.Biol.Cell* (Band 11), Nr. 2, Seite 627-634. URL: PM:10679019
- Nagata K. und Handa H (Eds) (2000): Real-Time Analysis of Biomolecular Interaction - Applications of BIACORE, Springer-Verlag Tokyo.
- Nagata, T.; Kurihara, Y.; Matsuda, G.; Saeki, J.; Kohno, T.; Yanagida, Y.; Ishikawa, F.; Uesugi, S. und Katahira, M. (1999): Structure and interactions with RNA of the N-terminal UUAG-specific RNA-binding domain of hnRNP D0, *J.Mol.Biol.* (Band 287), Nr. 2, Seite 221-237. URL: PM:10080887
- Nishikawa, K.; Toker, A.; Johannes, F. J.; Songyang, Z. und Cantley, L. C. (1997): Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 2, Seite 952-960. URL: PM:8995387
- Nitta, T.; Hata, M.; Gotoh, S.; Seo, Y.; Sasaki, H.; Hashimoto, N.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2003): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice, *J.Cell Biol.* (Band 161), Nr. 3, Seite 653-660. URL: PM:12743111
- Nunbhakdi-Craig, V.; Machleidt, T.; Ogris, E.; Bellotto, D.; White, C. L., III und Sontag, E. (2002): Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex, *J.Cell Biol.* (Band 158), Nr. 5, Seite 967-978. URL: PM:12196510
- Nusrat, A.; Chen, J. A.; Foley, C. S.; Liang, T. W.; Tom, J.; Cromwell, M.; Quan, C. und Mrsny, R. J. (2000): The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 38, Seite 29816-29822. URL: PM:10887180
- Oby, E. und Janigro, D. (2006): The blood-brain barrier and epilepsy, *Epilepsia* (Band 47), Nr. 11, Seite 1761-1774. URL: PM:17116015
- Olsen, O. und Bredt, D. S. (2003): Functional analysis of the nucleotide binding domain of membrane-associated guanylate kinases, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 9, Seite 6873-6878. URL: PM:12482754
- Paris, L.; Tonutti, L.; Vannini, C. und Bazzoni, G. (2008): Structural organization of the tight junctions, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 646-659. URL: PM:17945185

## Literaturverzeichnis

- Peng, B. H.; Lee, J. C. und Campbell, G. A. (2003): In vitro protein complex formation with cytoskeleton-anchoring domain of occludin identified by limited proteolysis, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 49, Seite 49644-49651. URL: PM:14512431
- Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* (Band 20), Nr. 18, Seite 3551-3567. URL: PM:10612281
- Piontek, J.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Muller, S. L.; Zuleger, N.; Piehl, C.; Wiesner, B.; Krause, G. und Blasig, I. E. (2008): Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins, *FASEB J.* (Band 22), Nr. 1, Seite 146-158. URL: PM:17761522
- Ponting, C. P. (1997): Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants, *Protein Sci.* (Band 6), Nr. 2, Seite 464-468. URL: PM:9041651
- Reed, M. C.; Thomas, R. L.; Pavisic, J.; James, S. J.; Ulrich, C. M. und Nijhout, H. F. (2008): A mathematical model of glutathione metabolism, *Theor.Biol.Med.Model.* (Band 5), Seite 8. URL: PM:18442411
- Reichert, M.; Muller, T. und Hunziker, W. (2000): The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 13, Seite 9492-9500. URL: PM:10734097
- Reuss, L. (2001): Isolated-polarized epithelial cells as an experimental system for cell physiology studies, *J.Membr.Biol.* (Band 179), Nr. 1, Seite 1-12. URL: PM:11155205
- Riazuddin, S.; Ahmed, Z. M.; Fanning, A. S.; Lagziel, A.; Kitajiri, S.; Ramzan, K.; Khan, S. N.; Chattaraj, P.; Friedman, P. L.; Anderson, J. M.; Belyantseva, I. A.; Forge, A.; Riazuddin, S. und Friedman, T. B. (2006): Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 79), Nr. 6, Seite 1040-1051. URL: PM:17186462
- Ronne, H.; Carlberg, M.; Hu, G. Z. und Nehlin, J. O. (1991): Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis, *Mol.Cell Biol.* (Band 11), Nr. 10, Seite 4876-4884. URL: PM:1656215
- Ruffer, C. und Gerke, V. (2004): The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions, *Eur.J.Cell Biol.* (Band 83), Nr. 4, Seite 135-144. URL: PM:15260435
- Saitou, M.; Fujimoto, K.; Doi, Y.; Itoh, M.; Fujimoto, T.; Furuse, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 141), Nr. 2, Seite 397-408. URL: PM:9548718
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol.Biol.Cell* (Band 11), Nr. 12, Seite 4131-4142. URL: PM:11102513
- Sakakibara, A.; Furuse, M.; Saitou, M.; Ando-Akatsuka, Y. und Tsukita, S. (1997): Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation, *J.Cell Biol.* (Band 137), Nr. 6, Seite 1393-1401. URL: PM:9182670
- Sambrook, J; Fritsch E. und Maniatis T (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Press, USA.
- Scheich, C.; Leitner, D.; Sievert, V.; Leidert, M.; Schlegel, B.; Simon, B.; Letunic, I.; Bussow, K. und Diehl, A. (2004): Fast identification of folded human protein domains expressed in *E. coli* suitable for structural analysis, *BMC.Struct.Biol.* (Band 4), Seite 4. URL: PM:15113422
- Schmidt, A.; Utepbergenov, D. I.; Mueller, S. L.; Beyermann, M.; Schneider-Mergener, J.; Krause, G. und Blasig, I. E. (2004): Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation, *Cell Mol.Life Sci.* (Band 61), Nr. 11, Seite 1354-1365. URL: PM:15170513
- Schmitz, H.; Fromm, M.; Bentzel, C. J.; Scholz, P.; Detjen, K.; Mankertz, J.; Bode, H.; Epple, H. J.; Riecken, E. O. und Schulzke, J. D. (1999): Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6, *J.Cell Sci.* (Band 112 ( Pt 1)), Seite 137-146. URL: PM:9841910
- Seddon, A. M.; Curnow, P. und Booth, P. J. (2004): Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1666), Nr. 1-2, Seite 105-117. URL: PM:15519311

## Literaturverzeichnis

- Seth, A.; Sheth, P.; Elias, B. C. und Rao, R. (2007): Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 15, Seite 11487-11498. URL: PM:17298946
- Sheth, B.; Fesenko, I.; Collins, J. E.; Moran, B.; Wild, A. E.; Anderson, J. M. und Fleming, T. P. (1997): Tight junction assembly during mouse blastocyst formation is regulated by late expression of ZO-1 alpha+ isoform, *Development* (Band 124), Nr. 10, Seite 2027-2037. URL: PM:9169849
- Sheth, P.; Basuroy, S.; Li, C.; Naren, A. P. und Rao, R. K. (2003): Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 49, Seite 49239-49245. URL: PM:14500730
- Sibanda, B. L. und Thornton, J. M. (1985): Beta-hairpin families in globular proteins, *Nature* (Band 316), Nr. 6024, Seite 170-174. URL: PM:4010788
- Simionescu, M.; Simionescu, N. und Palade, G. E. (1976): Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins, *J.Cell Biol.* (Band 68), Nr. 3, Seite 705-723. URL: PM:1030708
- Simon, D. B.; Lu, Y.; Choate, K. A.; Velazquez, H.; Al Sabban, E.; Praga, M.; Casari, G.; Bettinelli, A.; Colussi, G.; Rodriguez-Soriano, J.; McCredie, D.; Milford, D.; Sanjad, S. und Lifton, R. P. (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption, *Science* (Band 285), Nr. 5424, Seite 103-106. URL: PM:10390358
- Soma, T.; Chiba, H.; Kato-Mori, Y.; Wada, T.; Yamashita, T.; Kojima, T. und Sawada, N. (2004): Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP, *Exp.Cell Res.* (Band 300), Nr. 1, Seite 202-212. URL: PM:15383327
- Sourisseau, T.; Georgiadis, A.; Tsapara, A.; Ali, R. R.; Pestell, R.; Matter, K. und Balda, M. S. (2006): Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA, *Mol.Cell Biol.* (Band 26), Nr. 6, Seite 2387-2398. URL: PM:16508013
- Staehelin, L. A. (1973): Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions, *J.Cell Sci.* (Band 13), Nr. 3, Seite 763-786. URL: PM:4203962
- Stark, M. J. (1996): Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation, *Yeast* (Band 12), Nr. 16, Seite 1647-1675. URL: PM:9123967
- Stevenson, B. R.; Anderson, J. M.; Braun, I. D. und Mooseker, M. S. (1989): Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance, *Biochem.J.* (Band 263), Nr. 2, Seite 597-599. URL: PM:2597123
- Stevenson, B. R.; Siliciano, J. D.; Mooseker, M. S. und 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, *J.Cell Biol.* (Band 103), Nr. 3, Seite 755-766. URL: PM:3528172
- Stuart, R. O. und Nigam, S. K. (1995): Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 92), Nr. 13, Seite 6072-6076. URL: PM:7597083
- Studier, F. W.; Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.* (Band 185), Seite 60-89. URL: PM:2199796
- Sun, H.; Dai, H.; Shaik, N. und Elmquist, W. F. (2003): Drug efflux transporters in the CNS, *Adv.Drug Deliv.Rev.* (Band 55), Nr. 1, Seite 83-105. URL: PM:12535575
- Tamura, A.; Kitano, Y.; Hata, M.; Katsuno, T.; Moriwaki, K.; Sasaki, H.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Noda, T.; Furuse, M.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (2008): Megaintestine in claudin-15-deficient mice, *Gastroenterology* (Band 134), Nr. 2, Seite 523-534. URL: PM:18242218
- Tanaka, M.; Kamata, R. und Sakai, R. (2005): EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 51, Seite 42375-42382. URL: PM:16236711
- Tapia, V.; Ay, B.; Triebus, J.; Wolter, E.; Boisguerin, P. und Volkmer, R. (2008): Evaluating the coupling efficiency of phosphorylated amino acids for SPOT synthesis, *J.Pept.Sci.* URL: PM:18816512
- Tolnay, M.; Vereshchagina, L. A. und Tsokos, G. C. (1999): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0B is a sequence-specific DNA-binding protein, *Biochem.J.* (Band 338 ( Pt 2)), Seite 417-425. URL:

PM:10024518

Tomko, R. P.; Xu, R. und Philipson, L. (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 94), Nr. 7, Seite 3352-3356. URL: PM:9096397

Traweger, A.; Fuchs, R.; Krizbai, I. A.; Weiger, T. M.; Bauer, H. C. und Bauer, H. (2003): The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 4, Seite 2692-2700. URL: PM:12403786

Tsao, C. C.; Geisen, C. und Abraham, R. T. (2004): Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling, *EMBO J.* (Band 23), Nr. 23, Seite 4660-4669. URL: PM:15538388

Tsapara, A.; Matter, K. und Balda, M. S. (2006): The heat-shock protein Apg-2 binds to the tight junction protein ZO-1 and regulates transcriptional activity of ZONAB, *Mol.Biol.Cell* (Band 17), Nr. 3, Seite 1322-1330. URL: PM:16407410

Umeda, K.; Ikenouchi, J.; Katahira-Tayama, S.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Nakayama, M.; Matsui, T.; Tsukita, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell* (Band 126), Nr. 4, Seite 741-754. URL: PM:16923393

Umeda, K.; Matsui, T.; Nakayama, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2004): Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 43, Seite 44785-44794. URL: PM:15292177

Utepbergenov, D. I.; Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2006): Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain, *J.Biol.Chem.* (Band 281), Nr. 34, Seite 24671-24677. URL: PM:16790439

Uversky, V. N. (1993): Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule, *Biochemistry* (Band 32), Nr. 48, Seite 13288-13298. URL: PM:8241185

Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2006): Claudins and epithelial paracellular transport, *Annu.Rev.Physiol* (Band 68), Seite 403-429. URL: PM:16460278

Van Itallie, C. M.; Gambling, T. M.; Carson, J. L. und Anderson, J. M. (2005): Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization, *J.Cell Sci.* (Band 118), Nr. Pt 7, Seite 1427-1436. URL: PM:15769849

Vasioukhin, V.; Bauer, C.; Yin, M. und Fuchs, E. (2000): Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion, *Cell* (Band 100), Nr. 2, Seite 209-219. URL: PM:10660044

Voltz, J. W.; Brush, M.; Sikes, S.; Steplock, D.; Weinman, E. J. und Shenolikar, S. (2007): Phosphorylation of PDZ1 domain attenuates NHERF-1 binding to cellular targets, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 46, Seite 33879-33887. URL: PM:17895247

Walker, J. M. eds. (2008): *Protein Protocols on CD-ROM*, Humana Press, NY,USA.

Watabe, M.; Nagafuchi, A.; Tsukita, S. und Takeichi, M. (1994): Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line, *J.Cell Biol.* (Band 127), Nr. 1, Seite 247-256. URL: PM:7929567

Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perriere, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; Male, D. K.; Roux, F.; Greenwood, J.; Romero, I. A. und Couraud, P. O. (2005): Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *FASEB J.* (Band 19), Nr. 13, Seite 1872-1874. URL: PM:16141364

Wiedemann, U.; Boisguerin, P.; Leben, R.; Leitner, D.; Krause, G.; Moelling, K.; Volkmer-Engert, R. und Oschkinat, H. (2004): Quantification of PDZ domain specificity, prediction of ligand affinity and rational design of super-binding peptides, *J.Mol.Biol.* (Band 343), Nr. 3, Seite 703-718. URL: PM:15465056

Willott, E.; Balda, M. S.; Fanning, A. S.; Jameson, B.; Van Itallie, C. und 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.Sci.U.S.A* (Band 90), Nr. 16, Seite 7834-7838. URL: PM:8395056

## Literaturverzeichnis

- Wittchen, E. S.; Haskins, J. und Stevenson, B. R. (1999): Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 49, Seite 35179-35185. URL: PM:10575001
- Wittchen, E. S.; Haskins, J. und Stevenson, B. R. (2000): Exogenous expression of the amino-terminal half of the tight junction protein ZO-3 perturbs junctional complex assembly, *J.Cell Biol.* (Band 151), Nr. 4, Seite 825-836. URL: PM:11076967
- Wittchen, E. S.; Haskins, J. und Stevenson, B. R. (2003): ZO-3 expression causes global changes to actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells: linking a tight junction protein to Rho GTPases, *Mol.Biol.Cell* (Band 14), Nr. 5, Seite 1757-1768. URL: PM:12802052
- Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Kraus, J.; Rascher-Eggstein, G.; Liebner, S.; Hamm, S.; Duffner, F.; Grote, E. H.; Risau, W. und Engelhardt, B. (2003): Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme, *Acta Neuropathol.* (Band 105), Nr. 6, Seite 586-592. URL: PM:12734665
- Wong, V. (1997): Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction, *Am.J.Physiol* (Band 273), Nr. 6 Pt 1, Seite C1859-C1867. URL: PM:9435490
- Wong, V. und Gumbiner, B. M. (1997): A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier, *J.Cell Biol.* (Band 136), Nr. 2, Seite 399-409. URL: PM:9015310
- Woo, P. L.; Ching, D.; Guan, Y. und Firestone, G. L. (1999): Requirement for Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signaling uncouples the glucocorticoid-induced junctional organization and transepithelial electrical resistance in mammary tumor cells, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 46, Seite 32818-32828. URL: PM:10551843
- Xu, J.; Kausalya, P. J.; Phua, D. C.; Ali, S. M.; Hossain, Z. und Hunziker, W. (2008): Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development, *Mol.Cell Biol.* (Band 28), Nr. 5, Seite 1669-1678. URL: PM:18172007
- Yamada, A.; Fujita, N.; Sato, T.; Okamoto, R.; Ooshio, T.; Hirota, T.; Morimoto, K.; Irie, K. und Takai, Y. (2006): Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells, *Oncogene* (Band 25), Nr. 37, Seite 5085-5102. URL: PM:16607281
- Yamamoto, T.; Harada, N.; Kano, K.; Taya, S.; Canaani, E.; Matsuura, Y.; Mizoguchi, A.; Ide, C. und Kaibuchi, K. (1997): The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 139), Nr. 3, Seite 785-795. URL: PM:9348294
- Yokoyama, S.; Tachibana, K.; Nakanishi, H.; Yamamoto, Y.; Irie, K.; Mandai, K.; Nagafuchi, A.; Monden, M. und Takai, Y. (2001): alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin, *Mol.Biol.Cell* (Band 12), Nr. 6, Seite 1595-1609. URL: PM:11408571
- Yonemura, S.; Itoh, M.; Nagafuchi, A. und Tsukita, S. (1995): Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells, *J.Cell Sci.* (Band 108 ( Pt 1)), Seite 127-142. URL: PM:7738090
- Zhang, Y.; Yeh, S.; Appleton, B. A.; Held, H. A.; Kausalya, P. J.; Phua, D. C.; Wong, W. L.; Lasky, L. A.; Wiesmann, C.; Hunziker, W. und Sidhu, S. S. (2006): Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families, *J.Biol.Chem.* (Band 281), Nr. 31, Seite 22299-22311. URL: PM:16737968
- Zhu, Y.; Carvey, P. M. und Ling, Z. (2006): Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain, *Brain Res.* (Band 1090), Nr. 1, Seite 35-44. URL: PM:16647047



## 8 Danksagung

Ich danke Dr. I.E. Blasig für die interessante Fragestellung und die freundliche Betreuung.

Dr. C. Rückert und Dr. R.F. Haseloff möchte ich herzlich für die Unterstützung während der Arbeit und die konstruktive Diskussion der Dissertationsschrift danken.

Den Kooperationspartnern, Dr. K.Gast, Dr. P. Boisguerin, Dr. A. Diehl, J. Eichhorst, Dr. M. Bienert, B. Piszczak, Dr. E. Krause und der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie des FMP, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich danken.

Ich danke meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen in der Arbeitsgruppe molekulare Zellphysiologie für die Hilfsbereitschaft, die gute Atmosphäre und die spannenden Diskussionen.

Ich bedanke mich bei allen Studenten, die mit mir im ZO-1 Team an den Experimenten gearbeitet haben, besonders Martin Voß und Peter Schläger.

Mein besonderer Dank gilt S. Bittmann für ihre engagierte technische Assistenz während der letzten zwei Jahre.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern, Martin Meusch, Lüder Diedrich, Regina Fest meine Geschwister und Freunde, die mich auf dem langen Weg durch das Studium begleitet und unterstützt haben.

## **9 Lebenslauf**

Wurde für die elektronische Veröffentlichung entfernt.

## 10 Publikationsliste

Teile dieser Dissertation sind in der unten genannten Publikation enthalten.

WALTER, J.K., C. RUECKERT, M. VOSS, S.L. MUELLER, J. PIONTEK, K. GAST, I.E. BLASIG.  
The oligomerization of the coiled-coil-domain of occludin is redox-sensitive. Ann. New York Acad. Sci.  
angenommen, erscheint 2009

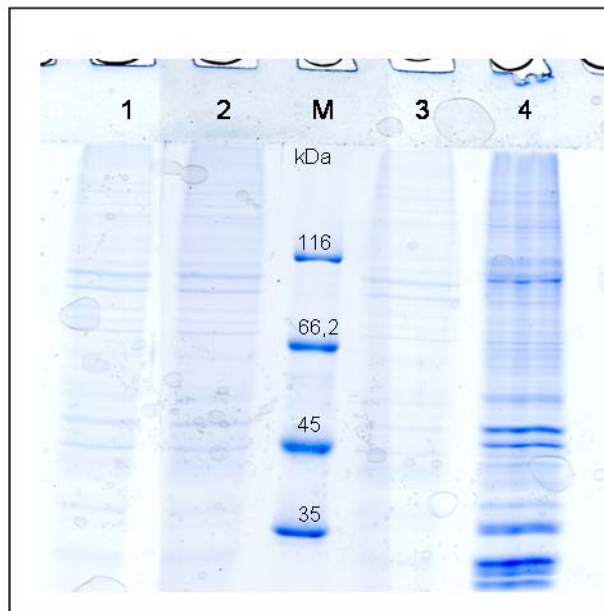
## **11 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung der Struktur, Funktion und Wechselwirkungen der tight junction Proteine Occludin und ZO-1“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die dem angestrebten Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung habe ich zur Kenntnis genommen. Ich habe mich anderweitig nicht um einen Doktorgrad beworben und bin nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Berlin, 11.11.2008

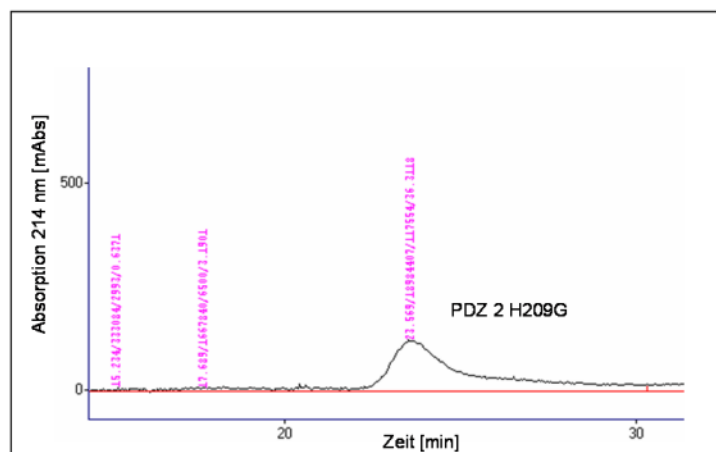
## 12 Anhang PDZ-Domänen von ZO-1

### 12.1 Elutionsfraktionen des *pull-down* Experiments aus Rattenepithelzellen



Die Banden 1 und 2 enthalten die Elutionsfraktionen der Kontrollen. Als Kontrolle wurde Strep-Taktin Sepharose mit  $^{12}\text{C}$  Rattenepithelzelllysat inkubiert. Die Spur 3 enthält die Elutionsfraktion des PDZ 1 *pull-down*-Experiments. Spur 4 zeigt die Elutionsfraktion aus dem PDZ 2 *pull-down*-Experiment. Beide wurden in  $^{13}\text{C}$  markiertem Rattenepithelzelllysat inkubiert. Die gleichen Volumina aus Kontrolle 1 und PDZ 1 sowie Kontrolle 2 und PDZ 2 wurden gemischt. Es ist ersichtlich, dass Proteine durch Inkubation mit der PDZ 2-Domäne gegenüber der Kontrolle angereichert wurden.

### 12.2 Größenausschlusschromatogramm der PDZ 2 Mutante



Größenausschlusschromatogramm der PDZ 2 Mutante mit Austausch von Histidin gegen Glycin in Position 209. Die PDZ-Domäne eluierte nach 23,6 Minuten von der Superdex 75 Säule.

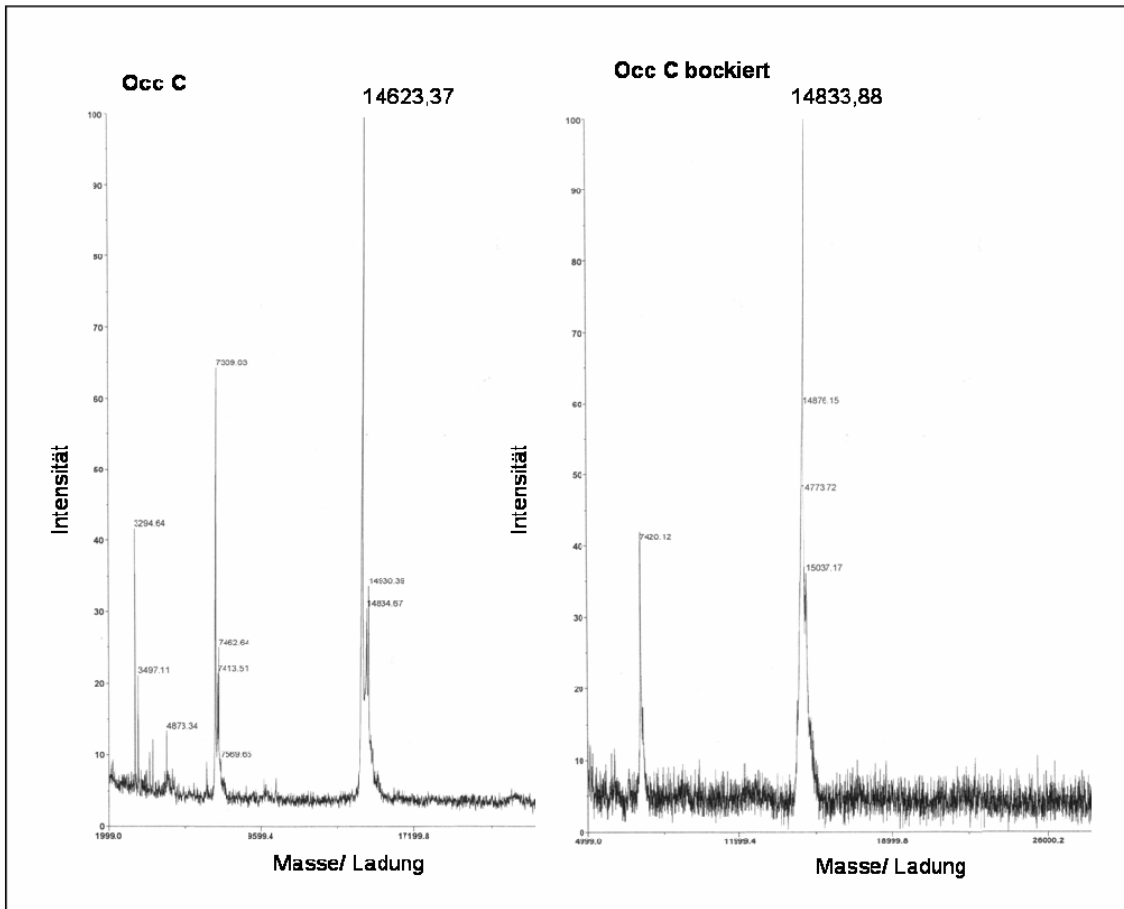
### 12.3 Expression und Reinigung der PDZ-Domänen 1 und 2 aus ZO-1

Die PDZ-Domänen wurden mit verschiedenen Domänengrenzen in den pTriEx6 Vektor von Novagen kloniert (Tab. 14). Die Expressionsbedingungen für die bakterielle Expression wurden in einem Expressionstest optimiert. Dabei wurde die Temperatur, der *E. coli* Stamm, die IPTG Konzentration sowie die Expressionsdauer variiert. Die PDZ 2 Varianten C (AS 185-279), C stop (AS 185-279 ohne 10x His) und I (AS 185-270 ohne 10xHis) ließen sich exprimieren. Die PDZ 1-Domäne wurde in den Grenzen von PDZ 1\_D (AS 22-103 ohne 10xHis) erfolgreich exprimiert. Als optimal stellte sich eine Temperatur von 37°C, 0,3 mM IPTG und 3 h Expressionszeit bei 220 rpm schütteln im *E. coli* Stamm Origami B(DE3)pLacI heraus. Die PDZ 2-Domäne mit C-terminalem 10x Histidin- und N-terminalem Strep-tag ließ sich nicht über Nickelagarose reinigen. Eine Reinigung über die N-terminale Strep-tag war möglich. Das gereinigte Fusionsprotein mit beiden Affinitätsanhängen präzipitierte leicht. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die basischen Histidine für die Nickelagarose nicht zugänglich waren. Da das Histidin-tag nicht für die Reinigung notwendig waren, wurden sie durch ein Stoppkodon abgetrennt. In der Zwischenzeit wurde die Kristallstruktur der PDZ 2-Domäne veröffentlicht (Fanning et al. 2007b). Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten aus der Publikation mit den weiteren Ergebnissen herzustellen, wurde die PDZ 2 als PDZ 2\_I-Domäne in den gleichen Grenzen kloniert (AS 185-270 ohne 10xHis). Für alle Untersuchungen wurde PDZ 1\_D und PDZ 2\_I verwendet.

### 12.4 Klonierung und Expression der PDZ 3 aus ZO-1

Die PDZ 3-Domäne ließ sich als PDZ 3, PDZ 3\_C und PDZ 3\_E exprimieren. Eine Reinigung als PDZ 3 über den His-tag war möglich. Die Proteine bildeten Aggregate, die auch in 8 M Harnstoff nicht aufzulösen waren. PDZ 3\_C war über den His-tag sehr schwach anreicherbar. Das entsprechende Protein ohne His-tag (PDZ 3\_E) ließ sich ebenfalls kaum über den Strep-tag anreichern. Da das Protein aus den sieben verschiedenen Plasmiden nicht möglich war, wurden im Folgenden nur die PDZ 1 und 2-Domäne in die Untersuchungen eingeschlossen.

### 13 Anhang Occludin



Spektrum von Occ C (links) Spektrum von mit Vinylpyridin blockierten Cysteinen (rechts)

Vinylpyridin hat eine Masse von 105 Da. Bei zwei Cysteinen entsteht eine Massendifferenz von 210 Da bei vollständiger Blockierung.

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

### Identifizierte Proteine im Pull-down-Experiment der PDZ 2-Domäne (660)

116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Bos taurus GN=EFTUD2 PE=2 SV=1  
 14-3-3 protein beta/alpha OS=Bos taurus GN=YWHAB PE=1 SV=2  
 14-3-3 protein epsilon OS=Bos taurus GN=YWHAE PE=2 SV=1  
 14-3-3 protein gamma OS=Bos taurus GN=YWHAG PE=1 SV=2  
 14-3-3 protein theta OS=Mus musculus GN=Ywhaq PE=1 SV=1  
 14-3-3 protein zeta/delta OS=Mus musculus GN=Ywhaz PE=1 SV=1  
 15 kDa selenoprotein OS=Danio rerio GN=sep15 PE=2 SV=2  
 2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Decr1 PE=1 SV=2  
 26S protease regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PSMC1 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Bos taurus GN=PSMD11 PE=2 SV=3  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Bos taurus GN=PSMD12 PE=2 SV=3  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Homo sapiens GN=PSMD14 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Bos taurus GN=PSMD2 PE=1 SV=2  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSMD3 PE=1 SV=2  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens GN=PSMD6 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Bos taurus GN=PSMD7 PE=2 SV=1  
 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein OS=Mus musculus GN=Pdap1 PE=1 SV=1  
 28S ribosomal protein S26, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrps26 PE=1 SV=1  
 28S ribosomal protein S27, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps27 PE=2 SV=1  
 28S ribosomal protein S6, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrps6 PE=2 SV=3  
 28S ribosomal protein S9, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS9 PE=2 SV=1  
 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ogdh PE=1 SV=3  
 39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Cricetus cricetus GN=MRPL12 PE=2 SV=1  
 39S ribosomal protein L15, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL15 PE=2 SV=1  
 39S ribosomal protein L21, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrpl21 PE=2 SV=1  
 39S ribosomal protein L41, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrpl41 PE=1 SV=1  
 39S ribosomal protein L9, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrpl9 PE=2 SV=1  
 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b10 PE=1 SV=3  
 40S ribosomal protein S10 OS=Bos taurus GN=RPS10 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S11 OS=Bos taurus GN=RPS11 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S12 OS=Bos taurus GN=RPS12 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S13 OS=Bos taurus GN=RPS13 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S14 OS=Cricetulus griseus GN=RPS14 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S15 OS=Gallus gallus GN=RPS15 PE=2 SV=2  
 40S ribosomal protein S15a OS=Bos taurus GN=RPS15A PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S16 OS=Bos taurus GN=RPS16 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S17 OS=Canis familiaris GN=RPS17 PE=2 SV=2  
 40S ribosomal protein S18 OS=Bos taurus GN=RPS18 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S19 OS=Mus musculus GN=Rps19 PE=1 SV=3  
 40S ribosomal protein S2 OS=Bos taurus GN=RPS2 PE=2 SV=2  
 40S ribosomal protein S20 OS=Bos taurus GN=RPS20 PE=3 SV=1  
 40S ribosomal protein S23 OS=Bos taurus GN=RPS23 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens GN=RPS24 PE=1 SV=1  
 40S ribosomal protein S25 OS=Bos taurus GN=RPS25 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S26 OS=Bos taurus GN=RPS26 PE=3 SV=3  
 40S ribosomal protein S27a OS=Bos taurus GN=RPS27A PE=3 SV=1  
 40S ribosomal protein S3 OS=Mus musculus GN=Rps3 PE=1 SV=1  
 40S ribosomal protein S3a OS=Rattus norvegicus GN=Rps3a PE=1 SV=2  
 40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Cercopithecus aethiops GN=RPS4X PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S5 OS=Bos taurus GN=RPS5 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RPS6 PE=1 SV=1  
 40S ribosomal protein S7 OS=Bos taurus GN=RPS7 PE=2 SV=1

### Swissprot Abkürzung

U5S1\_BOVIN (+3)  
 1433B\_BOVIN (+5)  
 1433E\_BOVIN (+4)  
 1433G\_BOVIN (+4)  
 1433T\_MOUSE (+2)  
 1433Z\_MOUSE (+1)  
 SEP15\_DANRE (+4)  
 DECR\_RAT  
 PRS4\_HUMAN (+2)  
 PSD11\_BOVIN (+2)  
 PSD12\_BOVIN (+3)  
 PSDE\_HUMAN (+1)  
 PSMD2\_BOVIN (+4)  
 PSMD3\_HUMAN (+1)  
 PSMD6\_HUMAN (+1)  
 PSD7\_BOVIN (+2)  
 HAP28\_MOUSE (+1)  
 RT26\_RAT  
 RT27\_MOUSE  
 RT06\_MOUSE  
 RT09\_HUMAN (+1)  
 ODO1\_MOUSE (+1)  
 RM12\_CRICR (+1)  
 RM15\_BOVIN (+1)  
 RM21\_MOUSE  
 RM41\_RAT  
 RM09\_RAT  
 HCD2\_RAT  
 RS10\_BOVIN (+3)  
 RS11\_BOVIN (+4)  
 RS12\_BOVIN (+3)  
 RS13\_BOVIN (+3)  
 RS14\_CRIGR (+3)  
 RS15\_CHICK (+6)  
 RS15A\_BOVIN (+3)  
 RS16\_BOVIN (+4)  
 RS17\_CANFA (+6)  
 RS18\_BOVIN (+6)  
 RS19\_MOUSE (+1)  
 RS2\_BOVIN (+3)  
 RS20\_BOVIN (+6)  
 RS23\_BOVIN (+5)  
 RS24\_HUMAN (+3)  
 RS25\_BOVIN (+4)  
 RS26\_BOVIN (+6)  
 RS27A\_BOVIN (+4)  
 RS3\_MOUSE (+1)  
 RS3A\_RAT  
 RS4X\_CERAE (+8)  
 RS5\_BOVIN (+3)  
 RS6\_HUMAN (+3)  
 RS7\_BOVIN (+4)



## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

40S ribosomal protein S8 OS=Bos taurus GN=RPS8 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S9 OS=Bos taurus GN=RPS9 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein SA OS=Bos taurus GN=RPSA PE=2 SV=4  
 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Cricetulus griseus GN=HSPD1 PE=2 SV=1  
 60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp0 PE=1 SV=2  
 60S acidic ribosomal protein P1 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp1 PE=3 SV=1  
 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp2 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=4  
 60S ribosomal protein L10a OS=Bos taurus GN=RPL10A PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L11 OS=Bos taurus GN=RPL11 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L12 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl12 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L13 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl13 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L13a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl13a PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L14 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl14 PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L15 OS=Bos taurus GN=RPL15 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L17 OS=Bos taurus GN=RPL17 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L18 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl18 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L18a OS=Mus musculus GN=Rpl18a PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L19 OS=Bos taurus GN=RPL19 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L21 OS=Mus musculus GN=Rpl21 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L23 OS=Bos taurus GN=RPL23 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L23a OS=Bos taurus GN=RPL23A PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L24 OS=Bos taurus GN=RPL24 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L26 OS=Bos taurus GN=RPL26 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L27 OS=Bos taurus GN=RPL27 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L27a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl27a PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L28 OS=Bos taurus GN=RPL28 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L29 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl29 PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L3 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl3 PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L30 OS=Bos taurus GN=RPL30 PE=3 SV=3  
 60S ribosomal protein L31 OS=Bos taurus GN=RPL31 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L32 OS=Homo sapiens GN=RPL32 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens GN=RPL34 PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L35a OS=Bos taurus GN=RPL35A PE=3 SV=1  
 60S ribosomal protein L36 OS=Homo sapiens GN=RPL36 PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L36a OS=Bos taurus GN=RPL36A PE=3 SV=3  
 60S ribosomal protein L37 OS=Bos taurus GN=RPL37 PE=3 SV=4  
 60S ribosomal protein L4 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl4 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L5 OS=Mus musculus GN=Rpl5 PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L6 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl6 PE=1 SV=5  
 60S ribosomal protein L7 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl7 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L7a OS=Bos taurus GN=RPL7A PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L8 OS=Bos taurus GN=RPL8 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L9 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl9 PE=1 SV=1  
 60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Nip7 PE=2 SV=1  
 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2  
 Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Mus musculus GN=Anp32a PE=1 SV=1  
 Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Mus musculus GN=Anp32b PE=1 SV=1  
 Actin, cytoplasmic 1 OS=Bos taurus GN=ACTB PE=1 SV=1  
 Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1  
 Actin-related protein 2/3 complex subunit 3 OS=Bos taurus GN=ARPC3 PE=1 SV=3  
 Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Bos taurus GN=ARPC4 PE=1 SV=3  
 Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=ASCC3 PE=1 SV=3

RS8\_BOVIN (+4)  
 RS9\_BOVIN (+4)  
 RSSA\_BOVIN (+7)  
 CH60\_CRIGR (+2)  
 RLA0\_RAT  
 RLA1\_RAT  
 RLA2\_RAT  
 RL10\_HUMAN (+5)  
 RL10A\_BOVIN (+3)  
 RL11\_BOVIN (+4)  
 RL12\_RAT  
 RL13\_RAT  
 RL13A\_RAT  
 RL14\_RAT  
 RL15\_BOVIN (+5)  
 RL17\_BOVIN (+2)  
 RL18\_RAT  
 RL18A\_MOUSE (+1)  
 RL19\_BOVIN (+5)  
 RL21\_MOUSE (+1)  
 RL22\_HUMAN (+3)  
 RL23\_BOVIN (+5)  
 RL23A\_BOVIN (+3)  
 RL24\_BOVIN (+5)  
 RL26\_BOVIN (+3)  
 RL27\_BOVIN (+6)  
 RL27A\_RAT  
 RL28\_BOVIN (+1)  
 RL29\_RAT  
 RL3\_RAT  
 RL30\_BOVIN (+4)  
 RL31\_BOVIN (+5)  
 RL32\_HUMAN (+4)  
 RL34\_HUMAN (+3)  
 RL35\_HUMAN (+2)  
 RL35A\_BOVIN (+5)  
 RL36\_HUMAN (+2)  
 RL36A\_BOVIN (+4)  
 RL37\_BOVIN (+3)  
 RL4\_RAT  
 RL5\_MOUSE (+1)  
 RL6\_RAT  
 RL7\_RAT  
 RL7A\_BOVIN (+4)  
 RL8\_BOVIN (+3)  
 RL9\_RAT  
 NIP7\_RAT  
 GRP78\_HUMAN (+3)  
 AN32A\_MOUSE  
 AN32B\_MOUSE (+1)  
 ACTB\_BOVIN (+21)  
 ARPC2\_HUMAN (+1)  
 ARPC3\_BOVIN (+2)  
 ARPC4\_BOVIN (+2)  
 HELC1\_HUMAN

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Rattus norvegicus GN=Apeh PE=1 SV=1  
 Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Macaca fascicularis GN=CAP1 PE=2 SV=3  
 ADP/ATP translocase 2 OS=Bos taurus GN=SLC25A5 PE=2 SV=3  
 ADP-ribosylation factor 4 OS=Mus musculus GN=Arf4 PE=2 SV=2  
 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Mesocricetus auratus GN=ALDH2 PE=1 SV=1  
 Aldose reductase-related protein 2 OS=Cricetulus griseus GN=AKR1B8 PE=1 SV=3  
 Alpha-actinin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Actn1 PE=1 SV=1  
 Alpha-actinin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Actn4 PE=1 SV=2  
 Alpha-centractin OS=Canis familiaris GN=ACTR1A PE=2 SV=1  
 Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2  
 Ankyrin repeat domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=ANKRD17 PE=1 SV=3  
 Annexin A1 OS=Mus musculus GN=Anxa1 PE=2 SV=2  
 Annexin A2 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa2 PE=1 SV=2  
 Annexin A3 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa3 PE=1 SV=4  
 Annexin A5 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa5 PE=1 SV=3  
 Annexin A8 OS=Bos taurus GN=ANXA8 PE=2 SV=1  
 AP-1 complex subunit beta-1 OS=Bos taurus GN=AP2B1 PE=2 SV=1  
 AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Bos taurus GN=AP2A2 PE=2 SV=1  
 AP-2 complex subunit sigma-1 OS=Bos taurus GN=AP2S1 PE=2 SV=1  
 AP-3 complex subunit beta-1 OS=Bos taurus GN=AP3B1 PE=2 SV=1  
 Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sapiens GN=API5 PE=1 SV=2  
 Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aifm1 PE=1 SV=1  
 Arginine and glutamate-rich protein 1 OS=Bos taurus GN=ARGLU1 PE=2 SV=1  
 Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Rars PE=2 SV=2  
 Arsenite-resistance protein 2 OS=Bos taurus GN=ARS2 PE=2 SV=1  
 Atlastin-3 OS=Mus musculus GN=Atl3 PE=2 SV=1  
 ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=2  
 ATP synthase subunit b, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1  
 ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3  
 ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5c1 PE=1 SV=2  
 ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5o PE=1 SV=1  
 ATP-binding cassette sub-family F member 1 OS=Rattus norvegicus GN=Abcf1 PE=1 SV=1  
 ATP-binding cassette sub-family F member 2 OS=Mus musculus GN=Abcf2 PE=2 SV=1  
 ATP-dependent DNA helicase Q1 OS=Rattus norvegicus GN=Recql PE=2 SV=1  
 ATP-dependent RNA helicase A OS=Mus musculus GN=Dhx9 PE=1 SV=2  
 ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Rattus norvegicus GN=Ddx1 PE=2 SV=1  
 ATP-dependent RNA helicase DDX18 OS=Mus musculus GN=Ddx18 PE=2 SV=1  
 ATP-dependent RNA helicase DDX24 OS=Mus musculus GN=Ddx24 PE=1 SV=1  
 ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Mus musculus GN=Ddx50 PE=2 SV=1  
 ATP-dependent RNA helicase DDX54 OS=Homo sapiens GN=DDX54 PE=1 SV=2  
 ATP-dependent RNA helicase DDX55 OS=Mus musculus GN=Ddx55 PE=2 SV=2  
 B box-binding protein OS=Xenopus laevis PE=2 SV=1  
 Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3  
 Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Eprs PE=2 SV=3  
 Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase OS=Mus musculus GN=Pnkp PE=1 SV=2  
 Brix domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Bxdc1 PE=2 SV=2  
 CAD protein OS=Mesocricetus auratus GN=CAD PE=1 SV=4  
 Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 OS=Mus musculus GN=Slc25a12 PE=1 SV=1  
 Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A13 PE=1 SV=2  
 Calcyclin-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Cacybp PE=1 SV=1  
 Calmodulin-alpha (Fragment) OS=Arbacia punctulata PE=2 SV=2  
 Calpain small subunit 1 OS=Homo sapiens GN=CAPNS1 PE=1 SV=1  
 Calpain-2 catalytic subunit OS=Rattus norvegicus GN=Capn2 PE=1 SV=3  
 CAP-Gly domain-containing linker protein 2 OS=Mus musculus GN=Clip2 PE=1 SV=2  
 Caprin-1 OS=Mus musculus GN=Caprin1 PE=1 SV=2

ACPH\_RAT  
 CAP1\_MACFA  
 ADT2\_BOVIN (+5)  
 ARF4\_MOUSE (+1)  
 ALDH2\_MESAU (+2)  
 ALD2\_CRIGR  
 ACTN1\_RAT  
 ACTN4\_RAT  
 ACTZ\_CANFA (+4)  
 CASA1\_BOVIN (+1)  
 ANR17\_HUMAN (+1)  
 ANXA1\_MOUSE (+1)  
 ANXA2\_RAT  
 ANXA3\_RAT  
 ANXA5\_RAT  
 ANXA8\_BOVIN (+2)  
 AP1B1\_BOVIN (+4)  
 AP2A2\_BOVIN (+3)  
 AP2S1\_BOVIN (+4)  
 AP3B1\_BOVIN (+1)  
 API5\_HUMAN (+2)  
 AIFM1\_RAT  
 ARGL1\_BOVIN (+3)  
 SYRC\_MOUSE  
 ARS2\_BOVIN (+4)  
 ATLA3\_MOUSE (+1)  
 ATPA\_RAT  
 AT5F1\_RAT  
 ATPB\_HUMAN (+2)  
 ATPG\_RAT  
 ATPO\_RAT  
 ABCF1\_RAT  
 ABCF2\_MOUSE  
 RECQ1\_RAT  
 DHX9\_MOUSE  
 DDX1\_RAT  
 DDX18\_MOUSE  
 DDX24\_MOUSE  
 DDX50\_MOUSE  
 DDX54\_HUMAN  
 DDX55\_MOUSE  
 YB3\_XENLA (+5)  
 LACB\_BOVIN (+1)  
 SYEP\_MOUSE  
 PNKP\_MOUSE  
 BXDC1\_MOUSE  
 PYR1\_MESAU  
 CMC1\_MOUSE  
 CMC2\_HUMAN (+1)  
 CYBP\_RAT  
 CALMA\_ARBPU (+27)  
 CPNS1\_HUMAN (+4)  
 CAN2\_RAT  
 CLIP2\_MOUSE (+2)  
 CAPR1\_MOUSE (+1)

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Carnitine O-palmitoyltransferase I, liver isoform OS=Rattus norvegicus GN=Cpt1a PE=1 SV=2  
 Casein kinase II subunit alpha OS=Bos taurus GN=CSNK2A1 PE=1 SV=1  
 Casein kinase II subunit alpha' OS=Bos taurus GN=CSNK2A2 PE=1 SV=3  
 Casein kinase II subunit beta OS=Bos taurus GN=CSNK2B PE=1 SV=1  
 CCAAT/enhancer-binding protein zeta OS=Mus musculus GN=Cebpz PE=2 SV=2  
 Cell division control protein 42 homolog OS=Bos taurus GN=CDC42 PE=2 SV=1  
 Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Chd1 PE=1 SV=2  
 Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 OS=Mus musculus GN=Chd4 PE=1 SV=1  
 Cisplatin resistance-associated overexpressed protein OS=Bos taurus GN=CROP PE=2 SV=1  
 Clathrin heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Cltc PE=1 SV=3  
 Cleavage and polyadenylation specificity factor 6 OS=Bos taurus GN=CPSF6 PE=2 SV=1  
 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 OS=Bos taurus GN=CPSF1 PE=1 SV=1  
 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 OS=Bos taurus GN=NUDT21 PE=2 SV=1  
 Coatmer subunit alpha OS=Mus musculus GN=Copa PE=1 SV=1  
 Coatmer subunit beta' OS=Bos taurus GN=COPB2 PE=1 SV=3  
 Coatmer subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Copb1 PE=1 SV=1  
 Coatmer subunit delta OS=Bos taurus GN=ARCN1 PE=1 SV=1  
 Coatmer subunit epsilon OS=Mus musculus GN=Cope PE=2 SV=3  
 Cofilin-1 OS=Bos taurus GN=CFL1 PE=2 SV=3  
 Coiled-coil domain-containing protein 124 OS=Mus musculus GN=Ccdc124 PE=2 SV=1  
 Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial OS=Bos taurus GN=CHCHD3 PE=2 SV=1  
 Cold-inducible RNA-binding protein OS=Cricetulus griseus GN=CIRBP PE=2 SV=1  
 Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM120A PE=1 SV=2  
 COP9 signalosome complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=GPS1 PE=1 SV=3  
 Copine-3 OS=Mus musculus GN=Cpne3 PE=1 SV=2  
 Cornulin OS=Homo sapiens GN=CRNN PE=1 SV=1  
 Coronin-1B OS=Rattus norvegicus GN=Coro1b PE=1 SV=1  
 Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Bos taurus GN=CAND1 PE=2 SV=1  
 CysteinyI-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Cars PE=1 SV=2  
 Cytochrome c OS=Ateles sp. GN=CYCS PE=1 SV=2  
 Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Bos taurus GN=COX5A PE=1 SV=2  
 Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Dync1h1 PE=1 SV=1  
 Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1h1 PE=2 SV=1  
 Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1i2 PE=1 SV=1  
 Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1 OS=Homo sapiens GN=DYNC1L1 PE=1 SV=3  
 Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=CYFIP1 PE=1 SV=1  
 Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Mus musculus GN=Ckap4 PE=2 SV=2  
 Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2  
 Dextrin OS=Mus musculus GN=Dstn PE=1 SV=3  
 Dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dld PE=1 SV=1  
 Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dlat PE=1 SV=3  
 Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dlst PE=1 SV=1  
 Dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Tfb1m PE=2 SV=1  
 DNA damage-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=DDB1 PE=2 SV=1  
 DNA replication licensing factor MCM2 OS=Mus musculus GN=Mcm2 PE=1 SV=3  
 DNA replication licensing factor MCM7 OS=Mus musculus GN=Mcm7 PE=2 SV=1  
 DNA topoisomerase 1 OS=Cricetulus griseus GN=TOP1 PE=2 SV=1  
 DNA topoisomerase 2-beta OS=Cricetulus longicaudatus GN=TOP2B PE=2 SV=1  
 DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 OS=Rattus norvegicus GN=Polr1a PE=1 SV=1  
 DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1 OS=Bos taurus GN=POLR2E PE=2 SV=1  
 DnaJ homolog subfamily C member 9 OS=Mus musculus GN=Dnajc9 PE=2 SV=2  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=DDOST PE=1 SV=2  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Rpn1 PE=2 SV=1  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rpn2 PE=2 SV=2  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A OS=Bos taurus GN=STT3A PE=2 SV=1

CPT1A\_RAT  
 CSK21\_BOVIN (+3)  
 CSK22\_BOVIN (+2)  
 CSK2B\_BOVIN (+7)  
 CEBPZ\_MOUSE  
 CDC42\_BOVIN (+3)  
 CHD1\_MOUSE  
 CHD4\_MOUSE  
 CROP\_BOVIN (+3)  
 CLH\_MOUSE (+1)  
 CPSF6\_BOVIN (+3)  
 CPSF1\_BOVIN (+2)  
 CPSF5\_BOVIN (+4)  
 COPA\_MOUSE  
 COPB2\_BOVIN (+5)  
 COPB\_RAT  
 COPD\_BOVIN (+4)  
 COPE\_MOUSE  
 COF1\_BOVIN (+6)  
 CC124\_MOUSE  
 CHCH3\_BOVIN (+2)  
 CIRBP\_CRIGR (+2)  
 F120A\_HUMAN  
 CSN1\_HUMAN (+2)  
 CPNE3\_MOUSE  
 CRNN\_HUMAN  
 COR1B\_RAT  
 CAND1\_BOVIN (+3)  
 SYCC\_MOUSE  
 CYC\_ATESP (+15)  
 COX5A\_BOVIN (+2)  
 DYHC1\_MOUSE  
 DYHC1\_RAT  
 DC1I2\_RAT  
 DC1L1\_HUMAN (+2)  
 CYFP1\_HUMAN (+1)  
 CKAP4\_MOUSE  
 DCD\_HUMAN  
 DEST\_MOUSE (+1)  
 DLDH\_RAT  
 ODP2\_RAT  
 ODO2\_MOUSE (+1)  
 TFB1M\_RAT  
 DDB1\_BOVIN (+4)  
 MCM2\_MOUSE  
 MCM7\_MOUSE  
 TOP1\_CRIGR (+1)  
 TOP2B\_CRILO (+1)  
 RPA1\_RAT  
 RPAB1\_BOVIN (+4)  
 DNJC9\_MOUSE  
 OST48\_HUMAN  
 RPN1\_RAT  
 RPN2\_RAT  
 STT3A\_BOVIN (+3)

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DCTN1 PE=1 SV=3  
 Dynactin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dctn2 PE=1 SV=1  
 Dynactin subunit 3 OS=Mus musculus GN=Dctn3 PE=2 SV=2  
 E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubr4 PE=2 SV=2  
 EH domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Ehd4 PE=1 SV=1  
 ELAV-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Elav1 PE=1 SV=1  
 Elongation factor 1-alpha 1 OS=Bos taurus GN=EEF1A1 PE=2 SV=1  
 Elongation factor 1-beta OS=Mus musculus GN=Eef1b PE=1 SV=5  
 Elongation factor 1-delta OS=Mus musculus GN=Eef1d PE=1 SV=3  
 Elongation factor 1-gamma OS=Rattus norvegicus GN=Eef1g PE=2 SV=3  
 Elongation factor 2 OS=Mesocricetus auratus GN=EEF2 PE=2 SV=3  
 Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Bos taurus GN=TUFM PE=1 SV=1  
 Endoplasmin OS=Bos taurus GN=HSP90B1 PE=2 SV=1  
 Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Eps8l2 PE=2 SV=1  
 Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Bos taurus GN=EIF4A1 PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal OS=Homo sapiens GN=EIF1AX PE=1 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Bos taurus GN=EIF2S1 PE=2 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 OS=Mus musculus GN=EIF2s2 PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Rattus norvegicus GN=EIF3b PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Mus musculus GN=EIF3c PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Mus musculus GN=EIF3d PE=1 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Homo sapiens GN=EIF3E PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E-interacting protein OS=Bos taurus GN=EIF3EIP PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens GN=EIF3F PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Bos taurus GN=EIF3G PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Bos taurus GN=EIF3H PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Rattus norvegicus GN=EIF3i PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Mus musculus GN=EIF3j PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Bos taurus GN=EIF3K PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Bos taurus GN=EIF3M PE=2 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Mus musculus GN=EIF4g1 PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Bos taurus GN=EIF5A PE=2 SV=3  
 Eukaryotic translation initiation factor 5B OS=Homo sapiens GN=EIF5B PE=1 SV=3  
 Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Mus musculus GN=EIF6 PE=2 SV=2  
 Exosome complex exonuclease RRP43 OS=Mus musculus GN=Exosc8 PE=2 SV=1  
 Exosome complex exonuclease RRP45 OS=Rattus norvegicus GN=Exosc9 PE=2 SV=1  
 Exosome complex exonuclease RRP46 OS=Mus musculus GN=Exosc5 PE=1 SV=1  
 Ezrin OS=Rattus norvegicus GN=Ezr PE=1 SV=3  
 FACT complex subunit SPT16 OS=Mus musculus GN=Supt16h PE=2 SV=2  
 FACT complex subunit SSRP1 OS=Mus musculus GN=Ssrp1 PE=1 SV=2  
 F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Aotus nancymae GN=CAPZA2 PE=3 SV=3  
 Far upstream element-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Khsrp PE=1 SV=1  
 Fatty acid synthase OS=Rattus norvegicus GN=Fasn PE=1 SV=3  
 Filamin-A OS=Mus musculus GN=Flna PE=1 SV=4  
 Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=1  
 Filamin-B OS=Mus musculus GN=Flnb PE=2 SV=2  
 FK506-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Fkbp3 PE=1 SV=2  
 Fragile X mental retardation protein 1 homolog OS=Pongo abelii GN=FMR1 PE=2 SV=1  
 Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Fxr1 PE=1 SV=2  
 FUS-interacting serine-arginine-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=FUSIP1 PE=1 SV=1  
 Galectin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Lgals3 PE=1 SV=4  
 Gelsolin OS=Rattus norvegicus GN=Gsn PE=1 SV=1  
 General transcription factor 3C polypeptide 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gtf3c1 PE=1 SV=1

DCTN1\_HUMAN (+2)  
 DCTN2\_RAT  
 DCTN3\_MOUSE  
 UBR4\_RAT  
 EHD4\_MOUSE  
 ELAV1\_MOUSE  
 EF1A1\_BOVIN (+10)  
 EF1B\_MOUSE  
 EF1D\_MOUSE  
 EF1G\_RAT  
 EF2\_MESAU (+2)  
 EFTU\_BOVIN (+1)  
 ENPL\_BOVIN (+6)  
 ES8L2\_MOUSE  
 IF4A1\_BOVIN (+6)  
 IF1AX\_HUMAN (+4)  
 IF2A\_BOVIN (+2)  
 IF2B\_MOUSE  
 IF2GL\_HUMAN (+5)  
 EIF3A\_HUMAN  
 EIF3B\_RAT  
 EIF3C\_MOUSE  
 EIF3D\_MOUSE  
 EIF3E\_HUMAN (+4)  
 IF3EI\_BOVIN (+2)  
 EIF3F\_HUMAN (+3)  
 EIF3G\_BOVIN (+2)  
 EIF3H\_BOVIN  
 EIF3I\_RAT  
 EIF3J\_MOUSE (+1)  
 EIF3K\_BOVIN (+2)  
 EIF3M\_BOVIN (+3)  
 IF4G1\_MOUSE  
 IF5A1\_BOVIN (+4)  
 IF2P\_HUMAN  
 IF6\_MOUSE  
 EXOS8\_MOUSE  
 EXOS9\_RAT  
 EXOS5\_MOUSE  
 EZRI\_RAT  
 SP16H\_MOUSE  
 SSRP1\_MOUSE (+1)  
 CAZA2\_AOTNA (+26)  
 FUBP2\_RAT  
 FAS\_RAT  
 FLNA\_MOUSE  
 FLNB\_HUMAN  
 FLNB\_MOUSE  
 FKBP3\_MOUSE  
 FMR1\_PONAB (+1)  
 FXR1\_MOUSE  
 FUSIP\_HUMAN (+1)  
 LEG3\_RAT  
 GELS\_RAT  
 TF3C1\_RAT

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

General transcription factor 3C polypeptide 4 OS=Homo sapiens GN=GTF3C4 PE=1 SV=1  
 Glucosidase 2 subunit beta OS=Mus musculus GN=PrkcsH PE=1 SV=1  
 Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Bos taurus GN=GLUD1 PE=1 SV=2  
 Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Grwd1 PE=2 SV=1  
 Glutamyl-tRNA synthetase OS=Bos taurus GN=QARS PE=2 SV=1  
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3  
 Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 OS=Bos taurus GN=NMT1 PE=1 SV=2  
 Glycyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Gars PE=1 SV=1  
 GTP-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=GTPBP1 PE=2 SV=2  
 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Bos taurus GN=GNB2L1 PE=2 SV=3  
 Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Rattus norvegicus GN=Gnl3 PE=1 SV=1  
 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 OS=Rattus norvegicus GN=Dkc1 PE=1 SV=4  
 Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=1 SV=2  
 Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4  
 Heat shock protein HSP 90-beta OS=Equus caballus GN=HSP90AB1 PE=2 SV=3  
 Heterochromatin protein 1-binding protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Hp1bp3 PE=2 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Mus musculus GN=Hnrnpab PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Bos taurus GN=HNRNPA1 PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpd PE=2 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=1 SV=3  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Bos taurus GN=HNRNPK PE=2 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Mus musculus GN=Hnrnpl PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like OS=Mus musculus GN=Hnrpll PE=1 SV=3  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Mus musculus GN=Hnrmpm PE=1 SV=3  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Mus musculus GN=Syncrip PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens GN=HNRNPR PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=5  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Hnrnpul2 PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Mus musculus GN=Hnrnpc PE=1 SV=1  
 High mobility group protein 1-like 10 OS=Homo sapiens GN=HMG1L10 PE=3 SV=1  
 High mobility group protein B2 OS=Rattus norvegicus GN=Hmgb2 PE=2 SV=2  
 Histone deacetylase 1 OS=Bos taurus GN=HDAC1 PE=2 SV=1  
 Histone H1.0 OS=Bos taurus GN=H1F0 PE=2 SV=3  
 Histone H1.2 OS=Mus musculus GN=Hist1h1c PE=1 SV=2  
 Histone H1.2 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h1c PE=1 SV=3  
 Histone H1x OS=Homo sapiens GN=H1FX PE=1 SV=1  
 Histone H2A type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2  
 Histone H2A.V OS=Bos taurus GN=H2AFV PE=2 SV=3  
 Histone H2A.x OS=Homo sapiens GN=H2AFX PE=1 SV=2  
 Histone H2B type 1-C/E/F/G/I OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BC PE=1 SV=3  
 Histone H3.1t OS=Homo sapiens GN=HIST3H3 PE=1 SV=3  
 Histone H4 OS=Bos taurus PE=1 SV=2  
 Importin subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Kpna2 PE=1 SV=2  
 Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2  
 Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=4  
 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Igf2bp1 PE=1 SV=1  
 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Igf2bp2 PE=1 SV=1  
 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Igf2bp3 PE=1 SV=1  
 Integrin alpha-6 OS=Mus musculus GN=Itga6 PE=2 SV=2  
 Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase OS=Rattus norvegicus GN=EIF2AK2 PE=1 SV=1  
 Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A OS=Mus musculus GN=Prkra PE=1 SV=1

TF3C4\_HUMAN (+1)  
 GLU2B\_MOUSE  
 DHE3\_BOVIN (+8)  
 GRWD1\_RAT  
 SYQ\_BOVIN  
 G3P\_RAT  
 NMT1\_BOVIN (+1)  
 SYG\_MOUSE  
 GTPB1\_BOVIN (+3)  
 GBLP\_BOVIN (+5)  
 GNL3\_RAT  
 DKC1\_RAT  
 HSP7C\_BOVIN (+5)  
 HS90A\_MOUSE (+1)  
 HS90B\_HORSE (+4)  
 HP1B3\_RAT  
 ROAA\_MOUSE  
 ROAA\_HUMAN  
 ROA1\_BOVIN (+4)  
 ROA3\_HUMAN (+2)  
 HNRPD\_RAT  
 HNRPF\_HUMAN (+3)  
 HNRPG\_HUMAN (+2)  
 HNRPK\_BOVIN (+6)  
 HNRPL\_MOUSE  
 HNRLL\_MOUSE  
 HNRPM\_MOUSE  
 HNRPQ\_MOUSE  
 HNRPR\_HUMAN  
 HNRPU\_HUMAN  
 HNR2\_MOUSE  
 ROA2\_HUMAN (+1)  
 HNRPC\_MOUSE (+1)  
 HMG1X\_HUMAN (+12)  
 HMGB2\_RAT  
 HDAC1\_BOVIN (+4)  
 H10\_BOVIN (+1)  
 H12\_MOUSE  
 H12\_RAT  
 H1X\_HUMAN  
 H2A1D\_HUMAN  
 H2AV\_BOVIN (+8)  
 H2AX\_HUMAN  
 H2B1C\_HUMAN (+15)  
 H31T\_HUMAN (+16)  
 H4\_BOVIN (+6)  
 IMA2\_MOUSE  
 IMB1\_HUMAN (+2)  
 IPO5\_HUMAN (+1)  
 IF2B1\_RAT  
 IF2B2\_MOUSE  
 IF2B3\_MOUSE  
 ITA6\_MOUSE  
 E2AK2\_RAT  
 PRKRA\_MOUSE

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Interferon-related developmental regulator 1 OS=Homo sapiens GN=IFRD1 PE=1 SV=4	IFRD1_HUMAN (+3)
Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=2	ILF2_HUMAN (+2)
Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Ilf3 PE=1 SV=2	ILF3_RAT
Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=lars PE=2 SV=1	SYIC_MOUSE
Junction plakoglobin OS=Bos taurus GN=JUP PE=2 SV=1	PLAK_BOVIN (+4)
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=4	K1C10_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=3	K1C14_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	K1C16_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3	K1C17_MOUSE (+1)
Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Rattus norvegicus GN=Krt18 PE=1 SV=3	K1C18_RAT
Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Rattus norvegicus GN=Krt19 PE=1 SV=2	K1C19_RAT
Keratin, type I cytoskeletal 20 OS=Rattus norvegicus GN=Krt20 PE=2 SV=2	K1C20_RAT
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=2	K1C9_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=5	K2C1_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Homo sapiens GN=KRT77 PE=2 SV=2	K2C1B_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=1	K22E_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	K2C6A_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Bos taurus GN=KRT7 PE=2 SV=1	K2C7_BOVIN
Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Mus musculus GN=Krt7 PE=2 SV=1	K2C7_MOUSE (+1)
Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3	K2C8_RAT
Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens GN=KIF5B PE=1 SV=1	KINH_HUMAN (+2)
Lamin-A OS=Rattus norvegicus GN=Lmna PE=1 SV=1	LMNA_RAT
Lamin-B receptor OS=Rattus norvegicus GN=Lbr PE=1 SV=1	LBR_RAT
Lamin-B1 OS=Mus musculus GN=Lmb1 PE=1 SV=3	LMNB1_MOUSE
La-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Larp1 PE=1 SV=2	LARP1_MOUSE
La-related protein 7 OS=Rattus norvegicus GN=Larp7 PE=1 SV=2	LARP7_RAT
Lethal(2) giant larvae protein homolog 1 OS=Bos taurus GN=LLGL1 PE=2 SV=1	L2GL1_BOVIN (+2)
Lethal(2) giant larvae protein homolog 2 OS=Mus musculus GN=Lgl2 PE=2 SV=2	L2GL2_MOUSE
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Lrpprc PE=1 SV=1	LPPRC_RAT
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Lrrfp1 PE=1 SV=1	LRRF1_RAT
Leucine-rich repeat-containing protein 47 OS=Mus musculus GN=Lrrc47 PE=1 SV=1	LRC47_MOUSE
Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRRC59 PE=1 SV=1	LRC59_HUMAN (+2)
Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Lars PE=2 SV=2	SYLC_MOUSE
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dbt PE=2 SV=1	ODB2_MOUSE
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha PE=1 SV=1	LDHA_RAT
L-lactate dehydrogenase B chain OS=Sus scrofa GN=LDHB PE=1 SV=3	LDHB_PIG
Loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2 gene A protein homolog OS=Rattus norvegicus GN=Loh11cr2a PE=2 SV=1	LHR2A_RAT
Low-density lipoprotein receptor OS=Rattus norvegicus GN=Ldlr PE=2 SV=1	LDLR_RAT
Lupus La protein homolog OS=Rattus norvegicus GN=Ssb PE=2 SV=1	LA_RAT
Lysyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Kars PE=1 SV=1	SYK_MOUSE
Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mdh1 PE=1 SV=3	MDHC_MOUSE (+1)
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mdh2 PE=1 SV=3	MDHM_MOUSE (+1)
Matrin-3 OS=Mus musculus GN=Matr3 PE=1 SV=1	MATR3_MOUSE (+1)
Metastasis-associated protein MTA2 OS=Homo sapiens GN=MTA2 PE=1 SV=1	MTA2_HUMAN (+1)
Methionine aminopeptidase 1 OS=Mus musculus GN=Metap1 PE=2 SV=1	AMPM1_MOUSE
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Mus musculus GN=Slc25a11 PE=1 SV=3	M2OM_MOUSE
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 OS=Mus musculus GN=Timm50 PE=1 SV=1	TIM50_MOUSE
Mitochondrial inner membrane protein OS=Mus musculus GN=Immt PE=1 SV=1	IMMT_MOUSE
Moesin OS=Mus musculus GN=Msn PE=1 SV=3	MOES_MOUSE
mRNA turnover protein 4 homolog OS=Mus musculus GN=Mrto4 PE=2 SV=1	MRT4_MOUSE
Multisynthetase complex auxiliary component p38 OS=Cricetulus griseus GN=JTV1 PE=2 SV=1	MCA2_CRIGR (+3)
Myb-binding protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Mybbp1a PE=2 SV=2	MBB1A_RAT
Myelin expression factor 2 OS=Mus musculus GN=Myef2 PE=1 SV=1	MYEF2_MOUSE
Myoferlin OS=Mus musculus GN=Fer113 PE=2 SV=2	MYOF_MOUSE
Myosin light polypeptide 6 OS=Bos taurus GN=MYL6 PE=2 SV=2	MYL6_BOVIN (+5)

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Myosin regulatory light chain 2-A, smooth muscle isoform OS=Rattus norvegicus GN=Rlc-a PE=2 SV=2  
 Myosin-14 OS=Mus musculus GN=Myh14 PE=2 SV=1  
 Myosin-9 OS=Mus musculus GN=Myh9 PE=1 SV=3  
 Myosin-9 OS=Rattus norvegicus GN=Myh9 PE=1 SV=3  
 Myosin-Ib OS=Rattus norvegicus GN=Myo1b PE=2 SV=1  
 Myosin-Ic OS=Mus musculus GN=Myo1c PE=1 SV=1  
 Myosin-XVIIIa OS=Mus musculus GN=Myo18a PE=1 SV=2  
 N-acetyltransferase 10 OS=Mus musculus GN=Nat10 PE=2 SV=1  
 N-acetylneuraminyl transferase OS=Mus musculus GN=Cmas PE=1 SV=2  
 Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Mus musculus GN=Naca PE=1 SV=1  
 Nck-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Nckap1 PE=2 SV=2  
 Neuroblast differentiation-associated protein AHNK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2  
 NHP2-like protein 1 OS=Bos taurus GN=NHP2L1 PE=2 SV=3  
 Nicalin OS=Rattus norvegicus GN=Ncln PE=2 SV=1  
 NMDA receptor-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=NARG1 PE=1 SV=1  
 Nodal modulator 1 OS=Homo sapiens GN=NOMO1 PE=1 SV=4  
 Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Mus musculus GN=Nono PE=1 SV=3  
 Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ncbp1 PE=1 SV=1  
 Nuclear protein NP60 OS=Bos taurus GN=NP60 PE=2 SV=1  
 Nuclear RNA export factor 1 OS=Homo sapiens GN=NXF1 PE=1 SV=1  
 Nucleolar GTP-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Gtbbp4 PE=2 SV=3  
 Nucleolar phosphoprotein p130 OS=Rattus norvegicus GN=Nolc1 PE=1 SV=1  
 Nucleolar protein 10 OS=Mus musculus GN=Nol10 PE=2 SV=1  
 Nucleolar protein 5 OS=Rattus norvegicus GN=Nol5 PE=1 SV=1  
 Nucleolar protein 5A OS=Mus musculus GN=Nol5a PE=1 SV=2  
 Nucleolar protein 6 OS=Homo sapiens GN=NOL6 PE=1 SV=2  
 Nucleolar RNA helicase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ddx21 PE=2 SV=1  
 Nucleolin OS=Rattus norvegicus GN=Ncl PE=1 SV=3  
 Nucleophosmin OS=Mus musculus GN=Npm1 PE=1 SV=1  
 Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Mus musculus GN=Nap111 PE=1 SV=2  
 Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Rattus norvegicus GN=Nap114 PE=2 SV=1  
 Obg-like ATPase 1 OS=Homo sapiens GN=OLA1 PE=1 SV=2  
 Paired amphipathic helix protein Sin3a OS=Homo sapiens GN=SIN3A PE=1 SV=2  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia PE=1 SV=2  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Rattus norvegicus GN=Ppib PE=2 SV=2  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H OS=Bos taurus GN=PPIH PE=2 SV=1  
 Perioplakin OS=Mus musculus GN=Ppl PE=1 SV=1  
 Peroxiredoxin-1 OS=Cricetulus griseus GN=PRDX1 PE=1 SV=1  
 Peroxiredoxin-2 OS=Mus musculus GN=Prdx2 PE=1 SV=3  
 Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1  
 Pescadillo homolog 1 OS=Mus musculus GN=Pes1 PE=1 SV=1  
 Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain OS=Rattus norvegicus GN=Farsa PE=1 SV=1  
 Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Mus musculus GN=Farsb PE=2 SV=1  
 Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1  
 Phosphoglycerate kinase 1 OS=Cricetulus griseus GN=PGK1 PE=2 SV=2  
 Phosphoglycerate mutase 1 OS=Bos taurus GN=PGAM1 PE=2 SV=3  
 Phosphoglycerate mutase family member 5 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam5 PE=2 SV=1  
 PITSLRE serine/threonine-protein kinase CDC2L1 OS=Homo sapiens GN=CDC2L1 PE=1 SV=3  
 Plakophilin-3 OS=Bos taurus GN=PKP3 PE=2 SV=1  
 Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Mus musculus GN=Serbp1 PE=1 SV=2  
 Plectin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plec1 PE=1 SV=2  
 Poly [ADP-ribose] polymerase 3 OS=Homo sapiens GN=PARP3 PE=1 SV=2  
 Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Mus musculus GN=Puf60 PE=2 SV=2  
 Polyadenylate-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Pabpc1 PE=1 SV=1  
 Polyadenylate-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=PABPC4 PE=1 SV=1  
 MLRA\_RAT (+10)  
 MYH14\_MOUSE  
 MYH9\_MOUSE  
 MYH9\_RAT  
 MYO1B\_RAT  
 MYO1C\_MOUSE  
 MY18A\_MOUSE  
 NAT10\_MOUSE  
 NEUA\_MOUSE (+1)  
 NACAM\_MOUSE (+6)  
 NCKP1\_MOUSE (+1)  
 AHNK\_HUMAN  
 NH2L1\_BOVIN (+4)  
 NCLN\_RAT  
 NARG1\_HUMAN (+2)  
 NOMO1\_HUMAN (+2)  
 NONO\_MOUSE (+1)  
 NCBP1\_RAT  
 NP60\_BOVIN (+5)  
 NXF1\_HUMAN (+1)  
 NOG1\_MOUSE  
 NOLC1\_RAT  
 NOL10\_MOUSE (+1)  
 NOL5\_RAT  
 NOL5A\_MOUSE  
 NOL6\_HUMAN  
 DDX21\_RAT  
 NUCL\_RAT  
 NPM\_MOUSE (+1)  
 NP1L1\_MOUSE  
 NP1L4\_RAT  
 OLA1\_HUMAN (+1)  
 SIN3A\_HUMAN (+1)  
 PPIA\_RAT  
 PPIB\_RAT  
 PPIH\_BOVIN (+2)  
 PEPL\_MOUSE  
 PRDX1\_CRIGR (+2)  
 PRDX2\_MOUSE (+1)  
 PECR\_RAT  
 PES\_MOUSE  
 SYFA\_RAT  
 SYFB\_MOUSE  
 MPCP\_MOUSE (+1)  
 PGK1\_CRIGR (+2)  
 PGAM1\_BOVIN (+8)  
 PGAM5\_RAT  
 CD2L1\_HUMAN (+1)  
 PKP3\_BOVIN (+2)  
 PAIRB\_MOUSE (+1)  
 PLEC1\_RAT  
 PARP3\_HUMAN  
 PUF60\_MOUSE (+1)  
 PABP1\_MOUSE (+1)  
 PABP4\_HUMAN

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Polymerase I and transcript release factor OS=Mus musculus GN=Ptrf PE=1 SV=1  
 Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ptbp1 PE=1 SV=1  
 Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pnpt1 PE=1 SV=1  
 Pre-mRNA branch site protein p14 OS=Homo sapiens GN=SF3B14 PE=1 SV=1  
 Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Mus musculus GN=Prpf19 PE=2 SV=1  
 Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A OS=Homo sapiens GN=PRPF40A PE=1 SV=2  
 Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens GN=PRPF8 PE=1 SV=2  
 Pre-mRNA-splicing factor SPF27 OS=Homo sapiens GN=BCAS2 PE=1 SV=1  
 Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog OS=Mus musculus GN=Tsr1 PE=2 SV=1  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23 OS=Homo sapiens GN=DDX23 PE=1 SV=3  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX31 OS=Homo sapiens GN=DDX31 PE=1 SV=2  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 OS=Mus musculus GN=Ddx46 PE=2 SV=2  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47 OS=Bos taurus GN=DDX47 PE=2 SV=1  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 PE=1 SV=1  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 OS=Mus musculus GN=Ddx56 PE=2 SV=1  
 Probable dimethyladenosine transferase OS=Mus musculus GN=Dimt11 PE=2 SV=1  
 Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 OS=Homo sapiens GN=TRIP12 PE=1 SV=1  
 Probable ribosome biogenesis protein RLP24 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1  
 Probable RNA-binding protein 19 OS=Mus musculus GN=Rbm19 PE=1 SV=1  
 Probable RNA-binding protein 25 OS=Homo sapiens GN=RBM25 PE=1 SV=2  
 Probable rRNA-processing protein EBP2 OS=Mus musculus GN=Ebna1bp2 PE=2 SV=1  
 Profilin-1 OS=Mus musculus GN=Pfn1 PE=1 SV=2  
 Programmed cell death protein 10 OS=Gallus gallus GN=PDCD10 PE=2 SV=1  
 Programmed cell death protein 4 OS=Homo sapiens GN=PDCD4 PE=1 SV=1  
 Prohibitin OS=Mus musculus GN=Phb PE=1 SV=1  
 Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2  
 Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 PE=1 SV=3  
 Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pelp1 PE=2 SV=2  
 Proteasome subunit alpha type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psm1 PE=1 SV=2  
 Proteasome subunit alpha type-2 OS=Mus musculus GN=Psm2 PE=1 SV=2  
 Proteasome subunit alpha type-3 OS=Bos taurus GN=PSMA3 PE=1 SV=3  
 Proteasome subunit alpha type-4 OS=Bos taurus GN=PSMA4 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-5 OS=Bos taurus GN=PSMA5 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-6 OS=Bos taurus GN=PSMA6 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-7 OS=Rattus norvegicus GN=Psm7 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit beta type-1 OS=Bos taurus GN=PSMB1 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit beta type-2 OS=Bos taurus GN=PSMB2 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit beta type-3 OS=Bos taurus GN=PSMB3 PE=1 SV=3  
 Proteasome subunit beta type-5 OS=Bos taurus GN=PSMB5 PE=2 SV=1  
 Proteasome subunit beta type-6 OS=Rattus norvegicus GN=Psm6 PE=1 SV=3  
 Proteasome subunit beta type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMB7 PE=1 SV=1  
 Protein arginine N-methyltransferase 5 OS=Bos taurus GN=PRMT5 PE=1 SV=1  
 Protein DEK OS=Rattus norvegicus GN=Dek PE=2 SV=1  
 Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2  
 Protein disulfide-isomerase A4 OS=Mus musculus GN=Pdia4 PE=1 SV=2  
 Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1  
 Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2  
 Protein kinase C delta-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Prkcdp PE=1 SV=1  
 Protein kinase C iota type OS=Homo sapiens GN=PRKCI PE=1 SV=1  
 Protein LYRIC OS=Rattus norvegicus GN=Mtdh PE=1 SV=2  
 Protein MAK10 homolog OS=Homo sapiens GN=MAK10 PE=2 SV=1  
 Protein RCC2 OS=Mus musculus GN=Rcc2 PE=2 SV=1  
 Protein RRP5 homolog OS=Homo sapiens GN=PDCD11 PE=1 SV=3  
 Protein SET OS=Rattus norvegicus GN=Set PE=1 SV=2  
 Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 OS=Bos taurus GN=SEC61A1 PE=2 SV=3

PTRF\_MOUSE (+1)  
 PTBP1\_RAT  
 PNPT1\_MOUSE  
 PM14\_HUMAN (+1)  
 PRP19\_MOUSE (+1)  
 PR40A\_HUMAN (+1)  
 PRP8\_HUMAN (+1)  
 SPF27\_HUMAN (+2)  
 TSR1\_MOUSE  
 DDX23\_HUMAN (+1)  
 DDX31\_HUMAN  
 DDX46\_MOUSE (+1)  
 DDX47\_BOVIN (+1)  
 DDX5\_HUMAN (+4)  
 DDX56\_MOUSE  
 DIMT1\_MOUSE  
 TRIPC\_HUMAN  
 RLP24\_RAT  
 RBM19\_MOUSE  
 RBM25\_HUMAN  
 EBP2\_MOUSE  
 PROF1\_MOUSE (+1)  
 PDC10\_CHICK (+2)  
 PDCD4\_HUMAN (+2)  
 PHB\_MOUSE (+1)  
 PHB2\_HUMAN (+3)  
 PA2G4\_HUMAN (+1)  
 PELP1\_RAT  
 PSA1\_RAT  
 PSA2\_MOUSE (+1)  
 PSA3\_BOVIN (+3)  
 PSA4\_BOVIN (+4)  
 PSA5\_BOVIN (+2)  
 PSA6\_BOVIN (+3)  
 PSA7\_RAT  
 PSB1\_BOVIN (+3)  
 PSB2\_BOVIN (+3)  
 PSB3\_BOVIN (+3)  
 PSB5\_BOVIN (+3)  
 PSB6\_RAT  
 PSB7\_HUMAN (+3)  
 ANM5\_BOVIN (+4)  
 DEK\_RAT  
 PDIA3\_RAT  
 PDIA4\_MOUSE (+1)  
 PDIA6\_HUMAN (+2)  
 PDIA1\_RAT  
 PRDBP\_RAT  
 KPCI\_HUMAN (+2)  
 LYRIC\_RAT  
 MAK10\_HUMAN (+4)  
 RCC2\_MOUSE  
 RRP5\_HUMAN  
 SET\_RAT  
 S61A1\_BOVIN (+5)



## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Protein VPRBP OS=Mus musculus GN=Vprbp PE=2 SV=4  
 Protein wibg homolog OS=Mus musculus GN=Wibg PE=1 SV=2  
 Prothymosin alpha OS=Rattus norvegicus GN=Ptma PE=1 SV=2  
 Pumilio domain-containing protein C14orf21 homolog OS=Mus musculus PE=2 SV=1  
 Pumilio domain-containing protein KIAA0020 homolog OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1  
 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX29 OS=Mus musculus GN=Dhx29 PE=2 SV=1  
 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Mus musculus GN=Dhx30 PE=2 SV=1  
 Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=1 SV=2  
 Putative RNA methyltransferase NOL1 OS=Mus musculus GN=Nol1 PE=2 SV=1  
 Putative RNA-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Rbm3 PE=2 SV=1  
 Putative RNA-binding protein Luc7-like 1 OS=Homo sapiens GN=LUC7L PE=1 SV=1  
 Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 OS=Homo sapiens GN=LUC7L2 PE=1 SV=2  
 Putative rRNA methyltransferase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Ftsj3 PE=2 SV=1  
 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Bos taurus GN=PDHA1 PE=2 SV=1  
 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pdhb PE=1 SV=2  
 Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Rattus norvegicus GN=Pkm2 PE=1 SV=3  
 Radixin OS=Bos taurus GN=RDX PE=2 SV=1  
 Ran GTPase-activating protein 1 OS=Mus musculus GN=Rangap1 PE=1 SV=1  
 Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1  
 Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=G3bp1 PE=1 SV=1  
 Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=G3bp2 PE=1 SV=2  
 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Mus musculus GN=Iqgap1 PE=1 SV=1  
 Ras-related protein Rab-10 OS=Canis familiaris GN=RAB10 PE=2 SV=1  
 Ras-related protein Rab-7a OS=Canis familiaris GN=RAB7A PE=2 SV=1  
 Replication factor C subunit 4 OS=Mus musculus GN=Rfc4 PE=2 SV=1  
 Ribonuclease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=Rnh1 PE=1 SV=2  
 Ribonuclease P protein subunit p30 OS=Mus musculus GN=Rpp30 PE=2 SV=1  
 Ribosomal protein L22-like 1 OS=Mus musculus GN=Rpl22l1 PE=1 SV=1  
 Ribosome biogenesis regulatory protein homolog OS=Mus musculus GN=Rrs1 PE=2 SV=1  
 Ribosome-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Rrbp1 PE=2 SV=2  
 RNA 3'-terminal phosphate cyclase OS=Bos taurus GN=RTCD1 PE=2 SV=1  
 RNA-binding protein 39 OS=Pongo abelii GN=RBM39 PE=2 SV=1  
 RNA-binding protein Raly OS=Mus musculus GN=Raly PE=1 SV=2  
 rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar OS=Homo sapiens GN=FBL PE=1 SV=2  
 RRP12-like protein OS=Mus musculus GN=Rrp12 PE=2 SV=1  
 RuvB-like 2 OS=Bos taurus GN=RUVBL2 PE=2 SV=3  
 S1 RNA-binding domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Srbd1 PE=1 SV=2  
 Selenocysteine-specific elongation factor OS=Mus musculus GN=Eefsec PE=2 SV=1  
 Septin-2 OS=Mus musculus GN=Sept2 PE=1 SV=2  
 Serine/threonine-protein kinase MRCK beta OS=Rattus norvegicus GN=Cdc42bpb PE=1 SV=1  
 Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog OS=Mus musculus GN=Prpf4b PE=1 SV=2  
 Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1A PE=1 SV=4  
 Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform OS=Bos taurus GN=PPP2CA PE=1 SV=1  
 Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Bos taurus GN=PPP1CB PE=2 SV=1  
 Serologically defined colon cancer antigen 1 homolog OS=Mus musculus GN=Sdcccag1 PE=2 SV=2  
 Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Bos taurus GN=SARS PE=2 SV=3  
 SET domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Setd3 PE=1 SV=1  
 Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Mus musculus GN=Srp14 PE=1 SV=1  
 Signal recognition particle 68 kDa protein OS=Canis familiaris GN=SRP68 PE=1 SV=1  
 Signal recognition particle 72 kDa protein OS=Canis familiaris GN=SRP72 PE=1 SV=3  
 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Bos taurus GN=SNRPD1 PE=3 SV=1  
 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Bos taurus GN=SNRPD2 PE=3 SV=1  
 Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B' OS=Bos taurus GN=SNRPB PE=2 SV=1  
 Sorting nexin-2 OS=Bos taurus GN=SNX2 PE=2 SV=1  
 Spectrin alpha chain, brain OS=Rattus norvegicus GN=Sptan1 PE=1 SV=2

VPRBP\_MOUSE  
 WIBG\_MOUSE  
 PTMA\_RAT  
 CN021\_MOUSE  
 K0020\_RAT  
 DHX29\_MOUSE  
 DHX30\_MOUSE (+1)  
 DHX15\_HUMAN (+2)  
 NOL1\_MOUSE  
 RBM3\_MOUSE  
 LUC7L\_HUMAN (+1)  
 LC7L2\_HUMAN (+1)  
 RRMJ3\_RAT  
 ODPB\_BOVIN (+7)  
 ODPB\_RAT  
 KPVM\_RAT  
 RAD1\_BOVIN (+1)  
 RAGP1\_MOUSE  
 G3BP1\_HUMAN (+1)  
 G3BP1\_MOUSE  
 G3BP2\_MOUSE  
 IQGA1\_MOUSE  
 RAB10\_CANFA (+3)  
 RAB7A\_CANFA (+5)  
 RFC4\_MOUSE  
 RINI\_RAT  
 RPP30\_MOUSE  
 RL22L\_MOUSE  
 RRS1\_MOUSE (+1)  
 RRBP1\_MOUSE  
 RTC1\_BOVIN (+2)  
 RBM39\_PONAB  
 RALY\_MOUSE  
 FBRL\_MOUSE (+2)  
 RRP12\_MOUSE  
 RUVB2\_BOVIN (+3)  
 SRBD1\_MOUSE  
 SELB\_MOUSE  
 SEPT2\_MOUSE (+1)  
 MRCKB\_RAT  
 PRP4B\_MOUSE (+1)  
 2AAA\_HUMAN (+2)  
 PP2AA\_BOVIN (+12)  
 PP1B\_BOVIN (+10)  
 SDCC1\_MOUSE  
 SYSC\_BOVIN (+6)  
 SETD3\_MOUSE  
 SRP14\_MOUSE  
 SRP68\_CANFA (+2)  
 SRP72\_CANFA (+1)  
 SMD1\_BOVIN (+3)  
 SMD2\_BOVIN (+2)  
 RSMB\_BOVIN (+12)  
 SNX2\_BOVIN (+4)  
 SPTA2\_RAT

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Spectrin beta chain, brain 1 OS=Homo sapiens GN=SPTBN1 PE=1 SV=2  
 Spectrin beta chain, brain 1 OS=Mus musculus GN=Sptbn1 PE=1 SV=2  
 Sphingosine-1-phosphate lyase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sgpl1 PE=2 SV=1  
 Spliceosome RNA helicase BAT1 OS=Bos taurus GN=BAT1 PE=2 SV=1  
 Splicing factor 3 subunit 1 OS=Bos taurus GN=SF3A1 PE=2 SV=1  
 Splicing factor 3A subunit 3 OS=Mus musculus GN=SF3a3 PE=2 SV=2  
 Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens GN=SF3B1 PE=1 SV=2  
 Splicing factor 3B subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SF3B2 PE=1 SV=1  
 Splicing factor 3B subunit 3 OS=Mus musculus GN=SF3b3 PE=2 SV=1  
 Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=U2AF2 PE=1 SV=4  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 1 OS=Bos taurus GN=SFRS1 PE=2 SV=1  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 10 OS=Bos taurus GN=SFRS10 PE=2 SV=1  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 12 OS=Homo sapiens GN=SFRS12 PE=1 SV=1  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 2 OS=Bos taurus GN=SFRS2 PE=2 SV=3  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 3 OS=Bos taurus GN=SFRS3 PE=2 SV=1  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 5 OS=Homo sapiens GN=SFRS5 PE=1 SV=1  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 6 OS=Homo sapiens GN=SFRS6 PE=1 SV=2  
 Splicing factor, arginine/serine-rich 7 OS=Bos taurus GN=SFRS7 PE=2 SV=1  
 Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2  
 Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 OS=Homo sapiens GN=SART3 PE=1 SV=1  
 Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Snd1 PE=2 SV=1  
 STE20-like serine/threonine-protein kinase OS=Rattus norvegicus GN=SIK PE=1 SV=1  
 Stress-70 protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspa9 PE=1 SV=3  
 Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Cricetulus griseus GN=STIP1 PE=2 SV=1  
 Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Bos taurus GN=SMC1A PE=1 SV=1  
 Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=Bos taurus GN=SMC3 PE=1 SV=1  
 Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Suclg1 PE=2 SV=1  
 Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sqrdl PE=2 SV=2  
 Superkiller viralicidic activity 2-like 2 OS=Mus musculus GN=Skiv2l2 PE=2 SV=1  
 Surfeit locus protein 6 OS=Mus musculus GN=Surf6 PE=2 SV=1  
 SWI/SNF complex subunit SMARCC2 OS=Homo sapiens GN=SMARCC2 PE=1 SV=1  
 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 OS=Homo sapiens GN=SMARCA5 PE=1 SV=1  
 Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3  
 TAR DNA-binding protein 43 OS=Mus musculus GN=Tardbp PE=1 SV=1  
 T-complex protein 1 subunit alpha OS=Cricetulus griseus GN=CCT1 PE=2 SV=1  
 T-complex protein 1 subunit beta OS=Bos taurus GN=CCT2 PE=2 SV=3  
 T-complex protein 1 subunit delta OS=Rattus norvegicus GN=Cct4 PE=1 SV=3  
 T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Cct5 PE=1 SV=1  
 T-complex protein 1 subunit eta OS=Mus musculus GN=Cct7 PE=1 SV=1  
 T-complex protein 1 subunit gamma OS=Rattus norvegicus GN=Cct3 PE=1 SV=1  
 T-complex protein 1 subunit theta OS=Mus musculus GN=Cct8 PE=1 SV=3  
 T-complex protein 1 subunit zeta OS=Mus musculus GN=Cct6a PE=1 SV=3  
 Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Prdx3 PE=1 SV=1  
 THO complex subunit 1 OS=Mus musculus GN=Thoc1 PE=2 SV=1  
 THO complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=THOC2 PE=1 SV=1  
 THO complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Thoc4 PE=1 SV=3  
 THO complex subunit 6 homolog OS=Homo sapiens GN=THOC6 PE=2 SV=1  
 Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Tars PE=1 SV=2  
 Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens GN=TJP1 PE=1 SV=3  
 Tight junction protein ZO-2 OS=Mus musculus GN=Tjp2 PE=1 SV=2  
 Transaldolase OS=Rattus norvegicus GN=Taldo1 PE=1 SV=2  
 Transcription elongation factor B polypeptide 2 OS=Mus musculus GN=Tceb2 PE=1 SV=1  
 Transcription factor A, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Tfam PE=2 SV=2  
 Transcription factor BTF3 homolog 4 OS=Bos taurus GN=BTF3L4 PE=2 SV=1  
 Transcription factor BTF3 OS=Homo sapiens GN=BTF3 PE=1 SV=1

SPTB2\_HUMAN  
 SPTB2\_MOUSE  
 SGPL1\_RAT  
 UAP56\_BOVIN (+8)  
 SF3A1\_BOVIN (+2)  
 SF3A3\_MOUSE  
 SF3B1\_HUMAN (+1)  
 SF3B2\_HUMAN  
 SF3B3\_MOUSE  
 U2AF2\_HUMAN (+1)  
 SFRS1\_BOVIN (+4)  
 TRA2B\_BOVIN (+3)  
 SFR12\_HUMAN (+2)  
 SFRS2\_BOVIN (+5)  
 SFRS3\_BOVIN (+2)  
 SFRS5\_HUMAN (+1)  
 SFRS6\_HUMAN  
 SFRS7\_BOVIN (+2)  
 SFPQ\_HUMAN (+1)  
 SART3\_HUMAN (+1)  
 SND1\_RAT  
 SLK\_RAT  
 GRP75\_RAT  
 STIP1\_CRIGR (+2)  
 SMC1A\_BOVIN (+3)  
 SMC3\_BOVIN (+4)  
 SUCA\_RAT  
 SQRD\_MOUSE  
 SK2L2\_MOUSE  
 SURF6\_MOUSE  
 SMRC2\_HUMAN (+1)  
 SMCA5\_HUMAN (+1)  
 TLN1\_HUMAN (+1)  
 TADBP\_MOUSE  
 TCPA\_CRIGR (+1)  
 TCPB\_BOVIN (+2)  
 TCPD\_RAT  
 TCPE\_RAT  
 TCPH\_MOUSE  
 TCPG\_RAT  
 TCPQ\_MOUSE  
 TCPZ\_MOUSE  
 PRDX3\_MOUSE  
 THOC1\_MOUSE (+1)  
 THOC2\_HUMAN  
 THOC4\_MOUSE  
 THOC6\_HUMAN (+2)  
 SYTC\_MOUSE (+1)  
 ZO1\_HUMAN  
 ZO2\_MOUSE  
 TALDO\_RAT  
 ELOB\_MOUSE (+1)  
 TFAM\_MOUSE (+1)  
 BT3L4\_BOVIN (+3)  
 BTF3\_HUMAN (+1)

## Anhang pull-down-Experiment PDZ 2

Transcription intermediary factor 1-beta OS=Mus musculus GN=Trim28 PE=1 SV=3  
 Transcriptional activator protein Pur-beta OS=Rattus norvegicus GN=Purb PE=1 SV=3  
 Transformation/transcription domain-associated protein OS=Mus musculus GN=Trrap PE=1 SV=2  
 Transgelin-2 OS=Mus musculus GN=Tagln2 PE=1 SV=3  
 Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Bos taurus GN=VCP PE=1 SV=1  
 Transketolase OS=Rattus norvegicus GN=Tkt PE=1 SV=1  
 Translocon-associated protein subunit alpha OS=Bos taurus GN=SSR1 PE=2 SV=1  
 Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1 OS=Bos taurus GN=TMCO1 PE=2 SV=1  
 Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 OS=Bos taurus GN=TMED10 PE=2 SV=1  
 Transmembrane protein 214 OS=Rattus norvegicus GN=Tmem214 PE=2 SV=1  
 Tricarboxylate transport protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=SLC25A1 PE=2 SV=1  
 Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hadha PE=1 SV=2  
 Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hadhb PE=1 SV=1  
 Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1 SV=2  
 Tripartite motif-containing protein 26 OS=Mus musculus GN=Trim26 PE=2 SV=2  
 Tripartite motif-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Trim3 PE=1 SV=1  
 Tripartite motif-containing protein 56 OS=Mus musculus GN=Trim56 PE=1 SV=1  
 Tropomyosin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tpm3 PE=1 SV=2  
 Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1  
 Tubulin alpha-1B chain OS=Pan troglodytes GN=TUBA1B PE=2 SV=1  
 Tubulin alpha-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBA4A PE=1 SV=2  
 Tubulin beta-2C chain OS=Bos taurus GN=TUBB2C PE=2 SV=1  
 Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 OS=Mus musculus GN=Tnfai2 PE=2 SV=1  
 Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Yars PE=2 SV=3  
 U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa OS=Bos taurus GN=SNRP70 PE=2 SV=1  
 U1 small nuclear ribonucleoprotein A OS=Bos taurus GN=SNRPA PE=2 SV=1  
 U2 small nuclear ribonucleoprotein A' OS=Homo sapiens GN=SNRPA1 PE=1 SV=2  
 U2 small nuclear ribonucleoprotein B' OS=Mus musculus GN=Snrpb2 PE=2 SV=1  
 U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31 OS=Homo sapiens GN=PRPF31 PE=1 SV=2  
 U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4 OS=Bos taurus GN=PRPF4 PE=2 SV=1  
 U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sart1 PE=2 SV=1  
 U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2 OS=Mus musculus GN=Usp39 PE=2 SV=2  
 U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=ASCC3L1 PE=1 SV=2  
 U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8 OS=Bos taurus GN=LSM8 PE=3 SV=3  
 UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 OS=Mus musculus GN=Ugcg11 PE=1 SV=2  
 UDP-glucuronosyltransferase 1-6 OS=Rattus norvegicus GN=Ugt1 PE=2 SV=1  
 UDP-glucuronosyltransferase 1-7 OS=Rattus norvegicus GN=Ugt1 PE=2 SV=1  
 Uncharacterized protein C1orf77 homolog OS=Bos taurus PE=2 SV=1  
 UPF0027 protein C22orf28 homolog OS=Mus musculus GN=D10Wsu52e PE=2 SV=1  
 UPF0384 protein CGI-117 homolog OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1  
 UPF0568 protein C14orf166 OS=Homo sapiens GN=C14orf166 PE=1 SV=1  
 UPF0629 protein C17orf42 homolog OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1  
 Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A OS=Bos taurus GN=ATP6V1A PE=2 SV=2  
 Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform OS=Bos taurus GN=ATP6V1B2 PE=1 SV=3  
 Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Bos taurus GN=VPS35 PE=2 SV=1  
 Valyl-tRNA synthetase OS=Rattus norvegicus GN=Vars PE=2 SV=2  
 Very low-density lipoprotein receptor OS=Homo sapiens GN=VLDLR PE=1 SV=1  
 Vesicle-associated membrane protein-associated protein A OS=Mus musculus GN=Vapa PE=1 SV=2  
 Vigilin OS=Rattus norvegicus GN=Hdlbp PE=1 SV=1  
 Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Bos taurus GN=VDAC1 PE=1 SV=3  
 Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus GN=Vdac2 PE=1 SV=2  
 WD repeat-containing protein 18 OS=Rattus norvegicus GN=Wdr18 PE=2 SV=1  
 WD repeat-containing protein 61 OS=Mus musculus GN=Wdr61 PE=2 SV=1  
 Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2 OS=Homo sapiens GN=WASF2 PE=1 SV=3  
 Zinc finger protein 771 OS=Mus musculus GN=Znf771 PE=2 SV=1

TIF1B\_MOUSE  
 PURB\_RAT  
 TRRAP\_MOUSE  
 TAGL2\_MOUSE  
 TERA\_BOVIN (+5)  
 TKT\_RAT  
 SSRA\_BOVIN (+6)  
 TMCO1\_BOVIN (+4)  
 TMEDA\_BOVIN (+5)  
 TM214\_RAT  
 TXTP\_BOVIN (+2)  
 ECHA\_RAT  
 ECHB\_RAT  
 TPIS\_RAT  
 TRI26\_MOUSE (+1)  
 TRIM3\_MOUSE  
 TRI56\_MOUSE  
 TPM3\_RAT  
 TRYP\_PIG  
 TBA1B\_PANTR  
 TBA4A\_BOVIN (+4)  
 TBB2C\_BOVIN (+3)  
 TNAP2\_MOUSE  
 SYYC\_RAT  
 RU17\_BOVIN (+2)  
 SNRPA\_BOVIN (+2)  
 RU2A\_HUMAN (+2)  
 RU2B\_MOUSE  
 PRP31\_HUMAN (+1)  
 PRP4\_BOVIN (+3)  
 SNUT1\_RAT  
 SNUT2\_MOUSE  
 U520\_HUMAN  
 LSM8\_BOVIN (+3)  
 UGGG1\_MOUSE (+1)  
 UD16\_RAT  
 UD17\_RAT  
 CA077\_BOVIN (+2)  
 CV028\_MOUSE (+1)  
 U384\_RAT  
 CN166\_HUMAN (+1)  
 CQ042\_RAT  
 VATA\_BOVIN (+1)  
 VATB2\_BOVIN (+4)  
 VPS35\_BOVIN (+1)  
 SYVC\_RAT  
 VLDLR\_HUMAN (+3)  
 VAPA\_MOUSE (+1)  
 VIGLN\_RAT  
 VDAC1\_BOVIN (+5)  
 VDAC2\_MOUSE (+1)  
 WDR18\_RAT  
 WDR61\_MOUSE (+1)  
 WASF2\_HUMAN (+1)  
 ZN771\_MOUSE

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Zinc finger protein 800 OS=Mus musculus GN=Znf800 PE=1 SV=1  
 Zinc finger protein 91 OS=Mus musculus GN=Zfp91 PE=1 SV=3  
 Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ZRANB2 PE=1 SV=2

ZN800\_MOUSE  
 ZFP91\_MOUSE  
 ZRAB2\_HUMAN (+4)

### Identifizierte Proteine im Pull-down-Experiment von PDZ1 (582)

[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Bckdk PE=1 SV=2  
 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Bos taurus GN=EFTUD2 PE=2 SV=1  
 14-3-3 protein epsilon OS=Bos taurus GN=YWHAE PE=2 SV=1  
 14-3-3 protein eta OS=Bos taurus GN=YWHAH PE=1 SV=2  
 14-3-3 protein theta OS=Gallus gallus GN=YWHAQ PE=2 SV=1  
 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 OS=Homo sapiens GN=PLCB3 PE=1 SV=2  
 26S protease regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PSMC1 PE=1 SV=1  
 26S protease regulatory subunit 6A OS=Rattus norvegicus GN=Psmc3 PE=2 SV=1  
 26S protease regulatory subunit 6B OS=Bos taurus GN=PSMC4 PE=2 SV=1  
 26S protease regulatory subunit 7 OS=Bos taurus GN=PSMC2 PE=2 SV=3  
 26S protease regulatory subunit 8 OS=Bos taurus GN=PSMC5 PE=2 SV=1  
 26S protease regulatory subunit S10B OS=Homo sapiens GN=PSMC6 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 PE=1 SV=2  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Bos taurus GN=PSMD11 PE=2 SV=3  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Mus musculus GN=Psm12 PE=2 SV=3  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Mus musculus GN=Psm13 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Homo sapiens GN=PSMD14 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Bos taurus GN=PSMD2 PE=1 SV=2  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Mus musculus GN=Psm3 PE=2 SV=2  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 OS=Bos taurus GN=PSMD4 PE=2 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens GN=PSMD6 PE=1 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Bos taurus GN=PSMD7 PE=2 SV=1  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 OS=Mus musculus GN=Psm8 PE=2 SV=1  
 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein OS=Homo sapiens GN=PDAP1 PE=1 SV=1  
 28S ribosomal protein S25, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrps25 PE=2 SV=1  
 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ogdh PE=1 SV=1  
 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Bckdha PE=1 SV=1  
 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Bckdhb PE=2 SV=2  
 39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Cricetus cricetus GN=MRPL12 PE=2 SV=1  
 39S ribosomal protein L15, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL15 PE=2 SV=1  
 39S ribosomal protein L19, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mrpl19 PE=2 SV=1  
 39S ribosomal protein L41, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Mrpl41 PE=1 SV=1  
 39S ribosomal protein L43, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL43 PE=1 SV=1  
 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b10 PE=1 SV=3  
 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=1 SV=1  
 40S ribosomal protein S10 OS=Bos taurus GN=RPS10 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S13 OS=Bos taurus GN=RPS13 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S14 OS=Cricetus griseus GN=RPS14 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S15a OS=Bos taurus GN=RPS15A PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S16 OS=Bos taurus GN=RPS16 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S17 OS=Bos taurus GN=RPS17 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S18 OS=Bos taurus GN=RPS18 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S19 OS=Bos taurus GN=RPS19 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S2 OS=Bos taurus GN=RPS2 PE=2 SV=2  
 40S ribosomal protein S20 OS=Bos taurus GN=RPS20 PE=3 SV=1  
 40S ribosomal protein S24 OS=Bos taurus GN=RPS24 PE=2 SV=2

### Swissprot Abkürzung

BCKD\_RAT  
 U5S1\_BOVIN (+3)  
 1433E\_BOVIN (+5)  
 1433F\_BOVIN (+3)  
 1433T\_CHICK (+4)  
 PLCB3\_HUMAN (+1)  
 PRS4\_HUMAN (+2)  
 PRS6A\_RAT  
 PRS6B\_BOVIN (+3)  
 PRS7\_BOVIN (+5)  
 PRS8\_BOVIN (+5)  
 PRS10\_HUMAN (+2)  
 PSMD1\_HUMAN (+3)  
 PSD11\_BOVIN (+2)  
 PSD12\_MOUSE  
 PSD13\_MOUSE  
 PSDE\_HUMAN (+1)  
 PSMD2\_BOVIN (+4)  
 PSMD3\_MOUSE  
 PSMD4\_BOVIN (+2)  
 PSMD6\_HUMAN (+1)  
 PSD7\_BOVIN (+2)  
 PSMD8\_MOUSE  
 HAP28\_HUMAN (+2)  
 RT25\_RAT  
 ODO1\_RAT  
 ODBA\_MOUSE (+1)  
 ODBB\_MOUSE (+1)  
 RM12\_CRICR (+1)  
 RM15\_BOVIN (+2)  
 RM19\_MOUSE  
 RM41\_RAT  
 RM43\_HUMAN  
 HCD2\_RAT  
 THIM\_RAT  
 RS10\_BOVIN (+3)  
 RS13\_BOVIN (+5)  
 RS14\_CRIGR (+3)  
 RS15A\_BOVIN (+4)  
 RS16\_BOVIN (+6)  
 RS17\_BOVIN (+10)  
 RS18\_BOVIN (+8)  
 RS19\_BOVIN (+5)  
 RS2\_BOVIN (+3)  
 RS20\_BOVIN (+6)  
 RS24\_BOVIN (+6)

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

40S ribosomal protein S25 OS=Bos taurus GN=RPS25 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S3 OS=Mus musculus GN=Rps3 PE=1 SV=1  
 40S ribosomal protein S3a OS=Bos taurus GN=RPS3A PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Cercopithecus aethiops GN=RPS4X PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S6 OS=Bos taurus GN=RPS6 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S7 OS=Bos taurus GN=RPS7 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein S8 OS=Bos taurus GN=RPS8 PE=2 SV=3  
 40S ribosomal protein S9 OS=Bos taurus GN=RPS9 PE=2 SV=1  
 40S ribosomal protein SA OS=Bos taurus GN=RPSA PE=2 SV=4  
 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Cricetulus griseus GN=HSPD1 PE=2 SV=1  
 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein OS=Homo sapiens GN=TROVE2 PE=1 SV=2  
 60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp0 PE=1 SV=2  
 60S acidic ribosomal protein P1 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp1 PE=3 SV=1  
 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp2 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=4  
 60S ribosomal protein L10a OS=Bos taurus GN=RPL10A PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L11 OS=Bos taurus GN=RPL11 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L12 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl12 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L13 OS=Bos taurus GN=RPL13 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L13a OS=Mus musculus GN=Rpl13a PE=1 SV=4  
 60S ribosomal protein L17 OS=Bos taurus GN=RPL17 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L18 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl18 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L22 OS=Gallus gallus GN=RPL22 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L23a OS=Bos taurus GN=RPL23A PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L24 OS=Bos taurus GN=RPL24 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L26-like 1 OS=Homo sapiens GN=RPL26L1 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L27a OS=Rattus norvegicus GN=Rpl27a PE=1 SV=3  
 60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L31 OS=Bos taurus GN=RPL31 PE=2 SV=1  
 60S ribosomal protein L35a OS=Bos taurus GN=RPL35A PE=3 SV=1  
 60S ribosomal protein L4 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl4 PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L5 OS=Gallus gallus GN=RPL5 PE=2 SV=2  
 60S ribosomal protein L6 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl6 PE=1 SV=5  
 60S ribosomal protein L7 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl7 PE=1 SV=2  
 60S ribosomal protein L7a OS=Bos taurus GN=RPL7A PE=2 SV=3  
 60S ribosomal protein L9 OS=Bos taurus GN=RPL9 PE=2 SV=1  
 6-phosphofruktokinase, liver type OS=Rattus norvegicus GN=Pfkl PE=2 SV=3  
 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3  
 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2  
 Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acat1 PE=1 SV=1  
 Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Mus musculus GN=Anp32a PE=1 SV=1  
 Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Mus musculus GN=Anp32b PE=1 SV=1  
 Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ACO2 PE=1 SV=4  
 Actin, cytoplasmic type 5 OS=Gallus gallus PE=3 SV=1  
 Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B OS=Mus musculus GN=Arpc1b PE=2 SV=3  
 Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1  
 Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Bos taurus GN=ARPC4 PE=1 SV=3  
 Actin-related protein 2-A OS=Danio rerio GN=actr2a PE=2 SV=1  
 Actin-related protein 3 OS=Mus musculus GN=Actr3 PE=1 SV=3  
 Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Rattus norvegicus GN=Apeh PE=1 SV=1  
 Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 OS=Mus musculus GN=Acad11 PE=1 SV=2  
 Adenyl cyclase-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Cap1 PE=2 SV=3  
 ADP/ATP translocase 2 OS=Bos taurus GN=SLC25A5 PE=2 SV=3  
 Alanine-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mesocricetus auratus GN=AARS PE=2 SV=1  
 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Mesocricetus auratus GN=ALDH2 PE=1 SV=1

RS25\_BOVIN (+4)  
 RS3\_MOUSE (+1)  
 RS3A\_BOVIN (+5)  
 RS4X\_CERAE (+8)  
 RS6\_BOVIN (+4)  
 RS7\_BOVIN (+4)  
 RS8\_BOVIN (+4)  
 RS9\_BOVIN (+4)  
 RSSA\_BOVIN (+8)  
 CH60\_CRIGR (+2)  
 RO60\_HUMAN (+1)  
 RLA0\_RAT  
 RLA1\_RAT  
 RLA2\_RAT  
 RL10\_HUMAN (+5)  
 RL10A\_BOVIN (+3)  
 RL11\_BOVIN (+5)  
 RL12\_RAT  
 RL13\_BOVIN (+2)  
 RL13A\_MOUSE (+1)  
 RL17\_BOVIN (+4)  
 RL18\_RAT  
 RL22\_CHICK (+4)  
 RL23A\_BOVIN (+3)  
 RL24\_BOVIN (+5)  
 RL26L\_HUMAN (+5)  
 RL27A\_RAT  
 RL3\_HUMAN (+2)  
 RL31\_BOVIN (+6)  
 RL35A\_BOVIN (+5)  
 RL4\_RAT  
 RL5\_CHICK (+4)  
 RL6\_RAT  
 RL7\_RAT  
 RL7A\_BOVIN (+4)  
 RL9\_BOVIN (+4)  
 K6PL\_RAT  
 6PGD\_HUMAN (+1)  
 GRP78\_HUMAN (+3)  
 THIL\_MOUSE (+1)  
 AN32A\_MOUSE (+1)  
 AN32B\_MOUSE (+1)  
 ACON\_BOVIN (+3)  
 ACT5\_CHICK (+37)  
 ARC1B\_MOUSE (+1)  
 ARPC2\_HUMAN (+1)  
 ARPC4\_BOVIN (+2)  
 ARP2A\_DANRE (+10)  
 ARP3\_MOUSE (+1)  
 ACPH\_RAT  
 ACD11\_MOUSE  
 CAP1\_MOUSE (+1)  
 ADT2\_BOVIN (+4)  
 SYAC\_MESAU  
 ALDH2\_MESAU (+2)

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Alpha-actinin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Actn1 PE=1 SV=1  
 Alpha-actinin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Actn4 PE=1 SV=2  
 Alpha-centractin OS=Canis familiaris GN=ACTR1A PE=2 SV=1  
 Alpha-enolase OS=Mus musculus GN=Eno1 PE=1 SV=3  
 Alpha-mannosidase 2 OS=Mus musculus GN=Man2a1 PE=1 SV=1  
 Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2  
 Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2  
 Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napa PE=1 SV=1  
 Annexin A2 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa2 PE=1 SV=2  
 Annexin A3 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa3 PE=1 SV=4  
 Annexin A5 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa5 PE=1 SV=3  
 Annexin A8 OS=Mus musculus GN=Anxa8 PE=2 SV=1  
 AP-1 complex subunit beta-1 OS=Bos taurus GN=AP2B1 PE=2 SV=1  
 AP-1 complex subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Ap1b1 PE=1 SV=1  
 AP-1 complex subunit mu-2 OS=Bos taurus GN=AP1M2 PE=1 SV=3  
 AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Bos taurus GN=AP2A2 PE=2 SV=1  
 AP-2 complex subunit mu-1 OS=Bos taurus GN=AP2M1 PE=2 SV=1  
 AP-3 complex subunit beta-1 OS=Bos taurus GN=AP3B1 PE=2 SV=1  
 AP-3 complex subunit delta-1 OS=Mus musculus GN=Ap3d1 PE=1 SV=1  
 Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sapiens GN=API5 PE=1 SV=2  
 Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aifm1 PE=1 SV=1  
 Argininosuccinate lyase OS=Bos taurus GN=ASL PE=2 SV=1  
 Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Rars PE=2 SV=2  
 Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Got2 PE=1 SV=1  
 Aspartyl aminopeptidase OS=Mus musculus GN=Dnpep PE=2 SV=1  
 Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Dars PE=2 SV=1  
 ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 PE=1 SV=2  
 ATP synthase subunit b, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1  
 ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5b PE=1 SV=2  
 ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5c1 PE=1 SV=1  
 ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5o PE=1 SV=1  
 ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Atad3 PE=1 SV=1  
 ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ABCB7 PE=1 SV=2  
 ATP-binding cassette sub-family D member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Abcd3 PE=1 SV=3  
 ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCE1 PE=1 SV=1  
 ATP-binding cassette sub-family F member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCF1 PE=1 SV=2  
 ATP-dependent RNA helicase A OS=Mus musculus GN=Dhx9 PE=1 SV=2  
 ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Rattus norvegicus GN=Ddx1 PE=2 SV=1  
 ATP-dependent RNA helicase DDX19A OS=Mus musculus GN=Ddx19a PE=1 SV=1  
 Beta-casein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2  
 Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus GN=LGB PE=1 SV=3  
 Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Eprs PE=2 SV=3  
 CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3  
 Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Mus musculus GN=Slc25a13 PE=1 SV=1  
 Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1 OS=Mus musculus GN=Slc25a24 PE=2 SV=1  
 Calcyclin-binding protein OS=Mus musculus GN=Cacybp PE=1 SV=1  
 Calmodulin-alpha (Fragment) OS=Arbacia punctulata PE=2 SV=2  
 Calnexin OS=Rattus norvegicus GN=Canx PE=1 SV=1  
 Calpain small subunit 1 OS=Mus musculus GN=Capns1 PE=2 SV=1  
 Calpain-2 catalytic subunit OS=Rattus norvegicus GN=Capn2 PE=1 SV=3  
 Calreticulin OS=Rattus norvegicus GN=Calr PE=1 SV=1  
 cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit OS=Rattus norvegicus GN=Prkar2a PE=1 SV=3  
 Carnitine O-palmitoyltransferase I, liver isoform OS=Mus musculus GN=Cpt1a PE=2 SV=4  
 Casein kinase II subunit alpha OS=Bos taurus GN=CSNK2A1 PE=1 SV=1  
 Catenin alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CTNNA1 PE=1 SV=1  
 ACTN1\_RAT  
 ACTN4\_RAT  
 ACTZ\_CANFA (+4)  
 ENOA\_MOUSE (+1)  
 MA2A1\_MOUSE  
 CASA1\_BOVIN  
 CASA2\_BOVIN  
 SNAA\_MOUSE (+1)  
 ANXA2\_RAT  
 ANXA3\_RAT  
 ANXA5\_RAT  
 ANXA8\_MOUSE (+1)  
 AP1B1\_BOVIN (+4)  
 AP1B1\_RAT  
 AP1M2\_BOVIN (+2)  
 AP2A2\_BOVIN (+3)  
 AP2M1\_BOVIN (+9)  
 AP3B1\_BOVIN (+2)  
 AP3D1\_MOUSE  
 API5\_HUMAN (+2)  
 AIFM1\_RAT  
 ARLY\_BOVIN (+2)  
 SYRC\_MOUSE  
 AATM\_MOUSE (+1)  
 DNPEP\_MOUSE  
 SYDC\_RAT  
 ATPA\_RAT  
 AT5F1\_RAT  
 ATPB\_RAT  
 ATPG\_MOUSE (+1)  
 ATPO\_RAT  
 ATAD3\_MOUSE (+1)  
 ABCB7\_HUMAN (+2)  
 ABCD3\_RAT  
 ABCE1\_HUMAN (+1)  
 ABCF1\_HUMAN (+4)  
 DHX9\_MOUSE  
 DDX1\_RAT  
 DD19A\_MOUSE (+3)  
 CASB\_BOVIN (+3)  
 LACB\_BOVIN (+1)  
 SYEP\_MOUSE  
 PYR1\_HUMAN (+1)  
 CMC2\_MOUSE  
 SCMC1\_MOUSE  
 CYBP\_MOUSE (+1)  
 CALMA\_ARBPU (+27)  
 CALX\_RAT  
 CPNS1\_MOUSE (+1)  
 CAN2\_RAT  
 CALR\_RAT  
 KAP2\_RAT  
 CPT1A\_MOUSE (+1)  
 CSK21\_BOVIN (+2)  
 CTNA1\_HUMAN (+2)

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Catenin beta-1 OS=Bos taurus GN=CTNNB1 PE=2 SV=1  
 Caveolin-1 OS=Aotus nancymaae GN=CAV1 PE=3 SV=1  
 CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Cdk5rap3 PE=1 SV=1  
 CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Cdipt PE=1 SV=1  
 Cell division control protein 42 homolog OS=Bos taurus GN=CDC42 PE=2 SV=1  
 Choline-phosphate cytidylyltransferase A OS=Cricetulus griseus GN=PCYT1A PE=2 SV=1  
 Cingulin OS=Mus musculus GN=Cgn PE=1 SV=1  
 Citrate synthase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cs PE=1 SV=1  
 Clathrin heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Cltc PE=1 SV=3  
 Cleavage and polyadenylation specificity factor 6 OS=Bos taurus GN=CPSF6 PE=2 SV=1  
 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 OS=Bos taurus GN=NUDT21 PE=2 SV=1  
 Coatamer subunit alpha OS=Mus musculus GN=Copa PE=1 SV=1  
 Coatamer subunit beta' OS=Homo sapiens GN=COPB2 PE=1 SV=2  
 Coatamer subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Copb1 PE=1 SV=1  
 Coatamer subunit delta OS=Bos taurus GN=ARCN1 PE=1 SV=1  
 Coatamer subunit epsilon OS=Mus musculus GN=Cope PE=2 SV=3  
 Coatamer subunit gamma OS=Mus musculus GN=Copg PE=2 SV=1  
 Coatamer subunit gamma-2 OS=Homo sapiens GN=COPG2 PE=1 SV=1  
 Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM120A PE=1 SV=2  
 COP9 signalosome complex subunit 3 OS=Bos taurus GN=COPS3 PE=2 SV=1  
 Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=CORO1C PE=1 SV=1  
 CTP synthase 1 OS=Homo sapiens GN=CTPS PE=1 SV=2  
 Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Mus musculus GN=Cand1 PE=2 SV=2  
 Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Uqcr1 PE=1 SV=1  
 Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Uqcr2 PE=1 SV=2  
 Cytochrome c OS=Ateles sp. GN=CYCS PE=1 SV=2  
 Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cox4i1 PE=1 SV=1  
 Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1h1 PE=2 SV=1  
 Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1li1 PE=1 SV=1  
 Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=CYFIP1 PE=1 SV=1  
 Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Mus musculus GN=Ckap4 PE=2 SV=2  
 Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2  
 Destrin OS=Mus musculus GN=Dstn PE=1 SV=3  
 Dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dld PE=1 SV=1  
 Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dlat PE=1 SV=3  
 Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dlst PE=1 SV=1  
 DNA damage-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=DDB1 PE=2 SV=1  
 DNA polymerase delta catalytic subunit OS=Bos taurus GN=POLD1 PE=1 SV=1  
 DNA replication licensing factor MCM2 OS=Mus musculus GN=Mcm2 PE=1 SV=3  
 DNA replication licensing factor MCM5 OS=Bos taurus GN=MCM5 PE=2 SV=1  
 DNA replication licensing factor MCM6 OS=Mus musculus GN=Mcm6 PE=1 SV=1  
 DNA replication licensing factor MCM7 OS=Mus musculus GN=Mcm7 PE=2 SV=1  
 DNA-binding protein A OS=Homo sapiens GN=CSDA PE=1 SV=4  
 DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 OS=Rattus norvegicus GN=Polr1b PE=1 SV=1  
 DnaJ homolog subfamily A member 2 OS=Homo sapiens GN=DNAJA2 PE=1 SV=1  
 DnaJ homolog subfamily B member 11 OS=Bos taurus GN=DNAJB11 PE=2 SV=1  
 DnaJ homolog subfamily C member 10 OS=Homo sapiens GN=DNAJC10 PE=1 SV=2  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Mus musculus GN=Ddost PE=1 SV=1  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Rpn1 PE=2 SV=1  
 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rpn2 PE=2 SV=2  
 Dynactin subunit 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dctn1 PE=2 SV=2  
 Dynactin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dctn2 PE=1 SV=1  
 Dynactin subunit 3 OS=Bos taurus GN=DCTN3 PE=2 SV=1  
 Dynamitin-2 OS=Bos taurus GN=DNM2 PE=2 SV=1  
 E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Rattus norvegicus GN=Ubr4 PE=2 SV=2  
 CTNB1\_BOVIN (+4)  
 CAV1\_AOTNA (+27)  
 CK5P3\_RAT  
 CDIPT\_RAT  
 CDC42\_BOVIN (+3)  
 PCY1A\_CRIGR (+3)  
 CING\_MOUSE  
 CISY\_RAT  
 CLH\_MOUSE (+1)  
 CPSF6\_BOVIN (+3)  
 CPSF5\_BOVIN (+5)  
 COPA\_MOUSE  
 COPB2\_HUMAN (+3)  
 COPB\_RAT  
 COPD\_BOVIN (+5)  
 COPE\_MOUSE  
 COPG\_MOUSE (+1)  
 COPG2\_HUMAN (+1)  
 F120A\_HUMAN  
 CSN3\_BOVIN (+6)  
 COR1C\_HUMAN (+1)  
 PYRG1\_HUMAN (+1)  
 CAND1\_MOUSE (+1)  
 QCR1\_RAT  
 QCR2\_RAT  
 CYC\_ATESP (+15)  
 COX41\_RAT  
 DYHC1\_RAT  
 DC1L1\_RAT  
 CYFP1\_HUMAN (+1)  
 CKAP4\_MOUSE  
 DCD\_HUMAN  
 DEST\_MOUSE (+1)  
 DLDH\_RAT  
 ODP2\_RAT  
 ODO2\_MOUSE (+1)  
 DDB1\_BOVIN (+4)  
 DPOD1\_BOVIN (+4)  
 MCM2\_MOUSE  
 MCM5\_BOVIN (+2)  
 MCM6\_MOUSE (+1)  
 MCM7\_MOUSE  
 DBPA\_HUMAN (+14)  
 RPA2\_RAT  
 DNJA2\_HUMAN (+1)  
 DJB11\_BOVIN (+5)  
 DJC10\_HUMAN (+3)  
 OST48\_MOUSE  
 RPN1\_RAT  
 RPN2\_RAT  
 DCTN1\_RAT  
 DCTN2\_RAT  
 DCTN3\_BOVIN (+1)  
 DYN2\_BOVIN (+3)  
 UBR4\_RAT

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Early endosome antigen 1 OS=Mus musculus GN=Eea1 PE=2 SV=2  
 Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 OS=Homo sapiens GN=EML4 PE=1 SV=2  
 EH domain-containing protein 1 OS=Bos taurus GN=EHD1 PE=2 SV=1  
 EH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=EHD2 PE=1 SV=2  
 EH domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Ehd4 PE=1 SV=1  
 ELAV-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Elav1 PE=1 SV=1  
 Electron transfer flavoprotein subunit beta OS=Mus musculus GN=Etfb PE=1 SV=3  
 Elongation factor 1-alpha 1 OS=Bos taurus GN=EEF1A1 PE=2 SV=1  
 Elongation factor 1-delta OS=Mus musculus GN=Eef1d PE=1 SV=3  
 Elongation factor 1-gamma OS=Rattus norvegicus GN=Eef1g PE=2 SV=3  
 Elongation factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Eef2 PE=1 SV=4  
 Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Bos taurus GN=TUFM PE=1 SV=1  
 Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1 OS=Homo sapiens GN=ERGIC1 PE=1 SV=1  
 Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1  
 Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Echs1 PE=1 SV=1  
 Ephrin type-A receptor 2 OS=Mus musculus GN=Epha2 PE=1 SV=2  
 Epidermal growth factor receptor substrate 15 OS=Mus musculus GN=Eps15 PE=1 SV=1  
 Epithelial cadherin OS=Rattus norvegicus GN=Cdh1 PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 4A-I OS=Bos taurus GN=EIF4A1 PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Bos taurus GN=EIF2S1 PE=2 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 OS=Mus musculus GN=EIF2s2 PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked OS=Mus musculus GN=EIF2s3x PE=1 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens GN=EIF3B PE=1 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Mus musculus GN=EIF3c PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Mus musculus GN=EIF3d PE=1 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Bos taurus GN=EIF3E PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E-interacting protein OS=Bos taurus GN=EIF3EIP PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens GN=EIF3F PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Bos taurus GN=EIF3G PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Bos taurus GN=EIF3H PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Rattus norvegicus GN=EIF3i PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Mus musculus GN=EIF3j PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Bos taurus GN=EIF3K PE=2 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Bos taurus GN=EIF3M PE=2 SV=2  
 Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Mus musculus GN=EIF4g1 PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 5 OS=Mus musculus GN=EIF5 PE=1 SV=1  
 Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Bos taurus GN=EIF5A PE=2 SV=3  
 Eukaryotic translation initiation factor 5B OS=Homo sapiens GN=EIF5B PE=1 SV=3  
 Exocyst complex component 3 OS=Bos taurus GN=EXOC3 PE=2 SV=1  
 Ezrin OS=Rattus norvegicus GN=Ezr PE=1 SV=3  
 F-actin-capping protein subunit beta OS=Bos taurus GN=CAPZB PE=1 SV=1  
 Far upstream element-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Khsrp PE=1 SV=1  
 Fatty acid synthase OS=Rattus norvegicus GN=Fasn PE=1 SV=3  
 Filamin-A OS=Mus musculus GN=Flna PE=1 SV=4  
 Filamin-B OS=Mus musculus GN=Flnb PE=2 SV=2  
 FK506-binding protein 5 OS=Homo sapiens GN=FKBP5 PE=1 SV=2  
 Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2  
 Galectin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Lgals3 PE=1 SV=4  
 Gelsolin OS=Rattus norvegicus GN=Gsn PE=1 SV=1  
 General vesicular transport factor p115 OS=Rattus norvegicus GN=Uso1 PE=1 SV=1  
 Glucose-6-phosphate isomerase OS=Cricetulus griseus GN=GPI PE=2 SV=1  
 Glucosidase 2 subunit beta OS=Mus musculus GN=Prkcsh PE=1 SV=1  
 Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Glud1 PE=1 SV=1  
 Glutaminyl-tRNA synthetase OS=Bos taurus GN=QARS PE=2 SV=1

EEA1\_MOUSE  
 EMAL4\_HUMAN (+1)  
 EHD1\_BOVIN (+4)  
 EHD2\_HUMAN (+2)  
 EHD4\_MOUSE  
 ELAV1\_MOUSE  
 ETFB\_MOUSE (+1)  
 EF1A1\_BOVIN (+11)  
 EF1D\_MOUSE  
 EF1G\_RAT  
 EF2\_RAT  
 EFTU\_BOVIN (+1)  
 ERG1\_HUMAN (+1)  
 ENPL\_HUMAN (+3)  
 ECHM\_MOUSE (+1)  
 EPHA2\_MOUSE  
 EP15\_MOUSE  
 CADH1\_RAT  
 IF4A1\_BOVIN (+5)  
 IF2A\_BOVIN (+2)  
 IF2B\_MOUSE  
 IF2G\_MOUSE  
 EIF3A\_HUMAN  
 EIF3B\_HUMAN (+2)  
 EIF3C\_MOUSE  
 EIF3D\_MOUSE  
 EIF3E\_BOVIN (+5)  
 IF3E\_BOVIN (+2)  
 EIF3F\_HUMAN (+3)  
 EIF3G\_BOVIN (+2)  
 EIF3H\_BOVIN  
 EIF3I\_RAT  
 EIF3J\_MOUSE (+1)  
 EIF3K\_BOVIN (+2)  
 EIF3M\_BOVIN (+3)  
 IF4G1\_MOUSE  
 IF5\_MOUSE (+1)  
 IF5A1\_BOVIN (+4)  
 IF2P\_HUMAN  
 EXOC3\_BOVIN (+3)  
 EZRI\_RAT  
 CAPZB\_BOVIN (+2)  
 FUBP2\_RAT  
 FAS\_RAT  
 FLNA\_MOUSE  
 FLNB\_MOUSE  
 FKBP5\_HUMAN (+1)  
 ALDOA\_RAT  
 LEG3\_RAT  
 GELS\_RAT  
 USO1\_RAT  
 G6PI\_CRIGR (+3)  
 GLU2B\_MOUSE  
 DHE3\_MOUSE (+1)  
 SYQ\_BOVIN



## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm2 PE=1 SV=2  
 Glutathione S-transferase P OS=Rattus norvegicus GN=Gstp1 PE=1 SV=2  
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Gapdh PE=1 SV=3  
 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Gpd2 PE=1 SV=1  
 Glycogen phosphorylase, brain form OS=Mus musculus GN=Pygb PE=1 SV=3  
 Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 OS=Bos taurus GN=NMT1 PE=1 SV=2  
 Glycyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Gars PE=1 SV=1  
 Guanine deaminase OS=Rattus norvegicus GN=Gda PE=1 SV=1  
 Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-1 subunit OS=Bos taurus GN=GNAI1 PE=2 SV=2  
 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Bos taurus GN=GNB2L1 PE=2 SV=3  
 Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Hspa4 PE=1 SV=1  
 Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=1 SV=2  
 Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Bos taurus GN=HSP90AA1 PE=2 SV=3  
 Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=4  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Mus musculus GN=Hnmpab PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Bos taurus GN=HNRNPA1 PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Bos taurus GN=HNRNPK PE=2 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Mus musculus GN=Hnrnpl PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Mus musculus GN=Hnrmpm PE=1 SV=3  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens GN=SYNCRIP PE=1 SV=2  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens GN=HNRNPR PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=5  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Hnrmpu2 PE=1 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Bos taurus GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1  
 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Mus musculus GN=Hnrmpc PE=1 SV=1  
 Histidyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Hars PE=2 SV=1  
 Histone H1.1 (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1  
 Histone H2A type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2  
 Histone H2B type 1-B OS=Mus musculus GN=Hist1h2bb PE=1 SV=3  
 Histone H3.1t OS=Homo sapiens GN=HIST3H3 PE=1 SV=3  
 Histone H4 type VIII OS=Gallus gallus GN=H4-VIII PE=3 SV=3  
 Histone-binding protein RBBP4 OS=Bos taurus GN=RBBP4 PE=1 SV=3  
 HIV Tat-specific factor 1 OS=Homo sapiens GN=HTATSF1 PE=1 SV=1  
 Huntingtin-interacting protein 1-related protein OS=Mus musculus GN=Hip1r PE=2 SV=1  
 Importin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens GN=KPNA3 PE=1 SV=2  
 Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNA1 PE=1 SV=2  
 Importin-5 OS=Mus musculus GN=Ipo5 PE=1 SV=3  
 Importin-7 OS=Homo sapiens GN=IPO7 PE=1 SV=1  
 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Cricetulus griseus GN=IMPDH2 PE=1 SV=1  
 Insulin-degrading enzyme OS=Rattus norvegicus GN=Ide PE=1 SV=1  
 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Igf2bp2 PE=1 SV=1  
 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Igf2bp3 PE=1 SV=1  
 Integrin alpha-3 OS=Mus musculus GN=Itga3 PE=1 SV=1  
 Integrin alpha-6 OS=Mus musculus GN=Itga6 PE=2 SV=2  
 Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=2  
 Inverted formin-2 OS=Mus musculus GN=Inf2 PE=1 SV=1  
 Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=lars PE=2 SV=3  
 Junction plakoglobin OS=Bos taurus GN=JUP PE=2 SV=1  
 Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1  
 Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=4  
 Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=3  
 Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4  
 GSTM2\_RAT  
 GSTP1\_RAT  
 G3P\_RAT  
 GPDM\_RAT  
 PYGB\_MOUSE (+1)  
 NMT1\_BOVIN (+1)  
 SYG\_MOUSE  
 GUAD\_RAT  
 GNAI1\_BOVIN (+20)  
 GBLP\_BOVIN (+6)  
 HSP74\_RAT  
 HSP7C\_BOVIN (+5)  
 HS90A\_BOVIN (+4)  
 HS90B\_RAT  
 ROAA\_MOUSE  
 ROA1\_BOVIN (+4)  
 ROA3\_HUMAN (+2)  
 HNRPD\_HUMAN (+2)  
 HNRPF\_HUMAN (+3)  
 HNRPK\_BOVIN (+6)  
 HNRPL\_MOUSE  
 HNRPM\_MOUSE  
 HNRPQ\_HUMAN (+1)  
 HNRPR\_HUMAN  
 HNRPU\_HUMAN  
 HNRL2\_MOUSE  
 ROA2\_BOVIN (+2)  
 HNRPC\_MOUSE (+1)  
 SYHC\_MOUSE  
 H11\_BOVIN (+6)  
 H2A1D\_HUMAN (+17)  
 H2B1B\_MOUSE (+20)  
 H31T\_HUMAN (+96)  
 H48\_CHICK (+53)  
 RBBP4\_BOVIN (+5)  
 HTSF1\_HUMAN (+2)  
 HIP1R\_MOUSE  
 IMA3\_HUMAN (+1)  
 IMB1\_HUMAN (+2)  
 IPO5\_MOUSE  
 IPO7\_HUMAN (+1)  
 IMDH2\_CRIGR (+2)  
 IDE\_RAT  
 IF2B2\_MOUSE  
 IF2B3\_MOUSE  
 ITA3\_MOUSE  
 ITA6\_MOUSE  
 ILF2\_HUMAN (+2)  
 INF2\_MOUSE  
 SYIC\_MOUSE  
 PLAK\_BOVIN (+4)  
 CASK\_BOVIN  
 K1C10\_HUMAN  
 K1C14\_HUMAN  
 K1C16\_HUMAN

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Rattus norvegicus GN=Krt18 PE=1 SV=3	K1C18_RAT
Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1 SV=3	K1C19_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Rattus norvegicus GN=Krt19 PE=1 SV=2	K1C19_RAT
Keratin, type I cytoskeletal 20 OS=Rattus norvegicus GN=Krt20 PE=2 SV=2	K1C20_RAT
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=2	K1C9_HUMAN
Keratin, type I microfibrillar 48 kDa, component 8C-1 OS=Ovis aries PE=1 SV=2	K1M1_SHEEP
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=5	K2C1_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=1	K2E_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	K2C5_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=4	K2C6B_HUMAN (+1)
Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Bos taurus GN=KRT7 PE=2 SV=1	K2C7_BOVIN
Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Mus musculus GN=Krt7 PE=2 SV=1	K2C7_MOUSE (+1)
Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Rattus norvegicus GN=Krt8 PE=1 SV=3	K2C8_RAT
Keratin, type II microfibrillar, component 7C OS=Ovis aries PE=1 SV=1	K2M2_SHEEP
Kinectin OS=Mus musculus GN=Ktn1 PE=1 SV=1	KTN1_MOUSE
Kinesin-1 heavy chain OS=Rattus norvegicus GN=Kif5b PE=2 SV=1	KINH_RAT
Lamin-A OS=Rattus norvegicus GN=Lmna PE=1 SV=1	LMNA_RAT
Lamin-B1 OS=Mus musculus GN=Lmnb1 PE=1 SV=3	LMNB1_MOUSE
Lethal(2) giant larvae protein homolog 2 OS=Mus musculus GN=Llg2 PE=2 SV=2	L2GL2_MOUSE
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Lrpprc PE=1 SV=1	LPPRC_RAT
Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Lars PE=2 SV=2	SYLC_MOUSE
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dbt PE=2 SV=1	ODB2_MOUSE
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha PE=1 SV=1	LDHA_RAT
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acadl PE=1 SV=1	ACADL_RAT
Loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2 gene A protein homolog OS=Rattus norvegicus GN=Loh11cr2a PE=2 SV=1	LHR2A_RAT
Low-density lipoprotein receptor OS=Rattus norvegicus GN=Ldlr PE=2 SV=1	LDLR_RAT
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 OS=Gallus gallus GN=LRP1 PE=2 SV=1	LRP1_CHICK (+2)
Lupus La protein homolog OS=Mus musculus GN=Ssb PE=2 SV=1	LA_MOUSE (+1)
Lysyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Kars PE=1 SV=1	SYK_MOUSE
Macrophage-capping protein OS=Rattus norvegicus GN=Capg PE=1 SV=1	CAPG_RAT
Major vault protein OS=Rattus norvegicus GN=Mvp PE=1 SV=4	MVP_RAT
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mdh2 PE=1 SV=3	MDHM_MOUSE (+1)
Matrin-3 OS=Mus musculus GN=Matr3 PE=1 SV=1	MATR3_MOUSE (+1)
Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mars PE=2 SV=1	MYMC_MOUSE
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Mus musculus GN=Sic25a11 PE=1 SV=3	M2OM_MOUSE
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 OS=Mus musculus GN=Timm50 PE=1 SV=1	TIM50_MOUSE
Mitochondrial inner membrane protein OS=Mus musculus GN=Immt PE=1 SV=1	IMMT_MOUSE
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS=Bos taurus GN=PMPCA PE=2 SV=1	MPPA_BOVIN (+1)
Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Bos taurus GN=MAPK1 PE=2 SV=3	MK01_BOVIN (+3)
Mitotic checkpoint protein BUB3 OS=Bos taurus GN=BUB3 PE=2 SV=1	BUB3_BOVIN (+3)
Moesin OS=Bos taurus GN=MSN PE=2 SV=3	MOES_BOVIN (+3)
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MTHFD1L PE=2 SV=2	C1TM_BOVIN (+2)
Myb-binding protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Mybbp1a PE=2 SV=2	MBB1A_RAT
Myelin expression factor 2 OS=Homo sapiens GN=MYEF2 PE=1 SV=2	MYEF2_HUMAN (+1)
Myoferlin OS=Mus musculus GN=Fer1f3 PE=2 SV=2	MYOF_MOUSE
Myosin light polypeptide 6 OS=Bos taurus GN=MYL6 PE=2 SV=2	MYL6_BOVIN (+5)
Myosin regulatory light chain 2-A, smooth muscle isoform OS=Rattus norvegicus GN=Rlc-a PE=2 SV=2	MLRA_RAT
Myosin-14 OS=Mus musculus GN=Myh14 PE=2 SV=1	MYH14_MOUSE
Myosin-9 OS=Mus musculus GN=Myh9 PE=1 SV=3	MYH9_MOUSE
Myosin-9 OS=Rattus norvegicus GN=Myh9 PE=1 SV=3	MYH9_RAT
Myosin-Ib OS=Rattus norvegicus GN=Myo1b PE=2 SV=1	MYO1B_RAT
Myosin-Ic OS=Mus musculus GN=Myo1c PE=1 SV=1	MYO1C_MOUSE
Myosin-XVIIIa OS=Mus musculus GN=Myo18a PE=1 SV=2	MY18A_MOUSE
N-acetylneuraminidase cytidyltransferase OS=Mus musculus GN=Cmas PE=1 SV=2	NEUA_MOUSE (+1)
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Mus musculus GN=Naca PE=1 SV=1	NACAM_MOUSE (+6)

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Nck-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=NCKAP1 PE=1 SV=1  
 Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2  
 Nodal modulator 1 OS=Homo sapiens GN=NOMO1 PE=1 SV=4  
 Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4  
 Nuclear pore complex protein Nup133 OS=Mus musculus GN=Nup133 PE=1 SV=1  
 Nucleolar phosphoprotein p130 OS=Rattus norvegicus GN=Nolc1 PE=1 SV=1  
 Nucleolar RNA helicase 2 OS=Mus musculus GN=Ddx21 PE=1 SV=2  
 Nucleolin OS=Rattus norvegicus GN=Ncl PE=1 SV=3  
 Nucleophosmin OS=Mus musculus GN=Npm1 PE=1 SV=1  
 Nucleoprotein TPR OS=Homo sapiens GN=TPR PE=1 SV=2  
 Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Mus musculus GN=Nap111 PE=1 SV=2  
 Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Rattus norvegicus GN=Nap114 PE=2 SV=1  
 Obg-like ATPase 1 OS=Homo sapiens GN=OLA1 PE=1 SV=2  
 Paraspeckle component 1 OS=Bos taurus GN=PSPC1 PE=2 SV=1  
 PDZ and LIM domain protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pdlim2 PE=1 SV=1  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Rattus norvegicus GN=Ppib PE=2 SV=2  
 Periplakin OS=Mus musculus GN=Ppl PE=1 SV=1  
 Peroxiredoxin-1 OS=Cricetulus griseus GN=PRDX1 PE=1 SV=1  
 Peroxiredoxin-2 OS=Mus musculus GN=Prdx2 PE=1 SV=3  
 Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx5 PE=1 SV=1  
 Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Rattus norvegicus GN=Hsd17b4 PE=1 SV=3  
 Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Rattus norvegicus GN=Pecr PE=2 SV=1  
 Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain OS=Rattus norvegicus GN=Farsa PE=1 SV=1  
 Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Mus musculus GN=Farsb PE=2 SV=1  
 Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1  
 Phosphoglycerate kinase 1 OS=Cricetulus griseus GN=PGK1 PE=2 SV=2  
 Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=1 SV=2  
 Plectin-1 OS=Homo sapiens GN=PLEC1 PE=1 SV=2  
 Poly(rC)-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=PCBP1 PE=2 SV=1  
 Polyadenylate-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=PABPC1 PE=2 SV=1  
 Polyadenylate-binding protein 2-B OS=Xenopus laevis GN=pabpn1-B PE=2 SV=1  
 Polymerase I and transcript release factor OS=Mus musculus GN=Ptrf PE=1 SV=1  
 Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ptbp1 PE=1 SV=1  
 Pre-mRNA branch site protein p14 OS=Homo sapiens GN=SF3B14 PE=1 SV=1  
 Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Mus musculus GN=Prpf19 PE=2 SV=1  
 Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens GN=PRPF8 PE=1 SV=2  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 PE=1 SV=1  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (Fragment) OS=Cavia porcellus GN=DDX6 PE=2 SV=1  
 Profilin-1 OS=Mus musculus GN=Pfn1 PE=1 SV=2  
 Programmed cell death protein 10 OS=Mus musculus GN=Pdc10 PE=2 SV=1  
 Programmed cell death protein 4 OS=Mus musculus GN=Pdc4 PE=1 SV=1  
 Programmed cell death protein 6 OS=Homo sapiens GN=PDCD6 PE=1 SV=1  
 Prohibitin OS=Mus musculus GN=Phb PE=1 SV=1  
 Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2  
 Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 PE=1 SV=3  
 Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pelp1 PE=2 SV=2  
 Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=P4ha1 PE=2 SV=2  
 Proteasome activator complex subunit 1 OS=Bos taurus GN=PSME1 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-1 OS=Bos taurus GN=PSMA1 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-2 OS=Bos taurus GN=PSMA2 PE=1 SV=3  
 Proteasome subunit alpha type-3 OS=Bos taurus GN=PSMA3 PE=1 SV=3  
 Proteasome subunit alpha type-4 OS=Bos taurus GN=PSMA4 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-5 OS=Bos taurus GN=PSMA5 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-6 OS=Bos taurus GN=PSMA6 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit alpha type-7 OS=Rattus norvegicus GN=Pma7 PE=1 SV=1

NCKP1\_HUMAN (+2)  
 AHNK\_HUMAN  
 NOMO1\_HUMAN (+2)  
 NONO\_HUMAN (+3)  
 NU133\_MOUSE  
 NOLC1\_RAT  
 DDX21\_MOUSE (+1)  
 NUCL\_RAT  
 NPM\_MOUSE (+1)  
 TPR\_HUMAN  
 NP1L1\_MOUSE (+1)  
 NP1L4\_RAT  
 OLA1\_HUMAN (+1)  
 PSPC1\_BOVIN (+3)  
 PDLI2\_RAT  
 PPIB\_RAT  
 PEPL\_MOUSE  
 PRDX1\_CRIGR (+1)  
 PRDX2\_MOUSE (+1)  
 PRDX5\_RAT  
 DHB4\_RAT  
 PECR\_RAT  
 SYFA\_RAT  
 SYFB\_MOUSE  
 MPCP\_MOUSE (+1)  
 PGK1\_CRIGR (+2)  
 PAIRB\_HUMAN (+2)  
 PLEC1\_HUMAN (+2)  
 PCBP1\_BOVIN (+3)  
 PABP1\_BOVIN (+4)  
 PAB2B\_XENLA (+4)  
 PTRF\_MOUSE (+1)  
 PTBP1\_RAT  
 PM14\_HUMAN (+1)  
 PRP19\_MOUSE (+1)  
 PRP8\_HUMAN (+1)  
 DDX5\_HUMAN (+4)  
 DDX6\_CAVPO (+4)  
 PROF1\_MOUSE (+1)  
 PDC10\_MOUSE (+2)  
 PDCC4\_MOUSE (+1)  
 PDCC6\_HUMAN (+1)  
 PHB\_MOUSE (+1)  
 PHB2\_HUMAN (+2)  
 PA2G4\_HUMAN (+1)  
 PELP1\_RAT  
 P4HA1\_MOUSE (+1)  
 PSME1\_BOVIN (+5)  
 PSA1\_BOVIN (+6)  
 PSA2\_BOVIN (+3)  
 PSA3\_BOVIN (+3)  
 PSA4\_BOVIN (+4)  
 PSA5\_BOVIN (+2)  
 PSA6\_BOVIN (+3)  
 PSA7\_RAT

## Anhang pull-down-Experiment von PDZ 1

Proteasome subunit beta type-1 OS=Mus musculus GN=Psmb1 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit beta type-2 OS=Rattus norvegicus GN=Psmb2 PE=1 SV=1  
 Proteasome subunit beta type-3 OS=Bos taurus GN=PSMB3 PE=1 SV=3  
 Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMB4 PE=1 SV=4  
 Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=3  
 Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2  
 Protein disulfide-isomerase A4 OS=Mus musculus GN=Pdia4 PE=1 SV=2  
 Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 PE=1 SV=2  
 Protein disulfide-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=P4hb PE=1 SV=2  
 Protein KIAA1967 homolog OS=Mus musculus PE=1 SV=2  
 Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 OS=Mus musculus GN=Pacsin2 PE=2 SV=1  
 Protein kinase C delta-binding protein OS=Homo sapiens GN=PRKCDBP PE=1 SV=1  
 Protein LSM12 homolog OS=Bos taurus GN=LSM12 PE=2 SV=2  
 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 OS=Rattus norvegicus GN=Ppp1r7 PE=1 SV=1  
 Protein RCC2 OS=Mus musculus GN=Rcc2 PE=2 SV=1  
 Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3  
 Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 OS=Bos taurus GN=SEC61A1 PE=2 SV=3  
 Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Mus musculus GN=Pcmt1 PE=1 SV=3  
 Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=1 SV=2  
 Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=PC PE=2 SV=2  
 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pdha1 PE=1 SV=1  
 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pdhb PE=1 SV=2  
 Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Mus musculus GN=Pkm2 PE=1 SV=4  
 Radixin OS=Bos taurus GN=RDY PE=2 SV=1  
 Ran GTPase-activating protein 1 OS=Mus musculus GN=Rangap1 PE=1 SV=1  
 Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1  
 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Mus musculus GN=Iqgap1 PE=1 SV=1  
 Ras-related protein Rab-11A OS=Bos taurus GN=RAB11A PE=2 SV=3  
 Ras-related protein Rab-5C OS=Bos taurus GN=RAB5C PE=2 SV=1  
 Ras-related protein Rab-7a OS=Canis familiaris GN=RAB7A PE=2 SV=1  
 Ras-related protein Rab-8A OS=Canis familiaris GN=RAB8A PE=2 SV=1  
 Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Homo sapiens GN=UPF1 PE=1 SV=2  
 Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit OS=Gallus gallus GN=RPA1 PE=2 SV=1  
 Reticulon-4 OS=Rattus norvegicus GN=Rtn4 PE=1 SV=1  
 Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Mus musculus GN=Arhgdia PE=1 SV=3  
 Rho-associated protein kinase 2 OS=Mus musculus GN=Rock2 PE=2 SV=1  
 Ribonuclease inhibitor OS=Rattus norvegicus GN=Rnh1 PE=1 SV=2  
 Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Bos taurus GN=PRPS1 PE=2 SV=3  
 RNA-binding protein Raly OS=Mus musculus GN=Raly PE=1 SV=2  
 Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2  
 RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1  
 RuvB-like 2 OS=Bos taurus GN=RUVBL2 PE=2 SV=3  
 SAPS domain family member 3 OS=Homo sapiens GN=SAPS3 PE=1 SV=2  
 Scaffold attachment factor B1 OS=Rattus norvegicus GN=Saftb PE=1 SV=2  
 Septin-11 OS=Mus musculus GN=Sept11 PE=1 SV=4  
 Septin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Sept2 PE=1 SV=1  
 Septin-7 OS=Bos taurus GN=SEPT7 PE=2 SV=2  
 Septin-9 OS=Rattus norvegicus GN=Sept9 PE=1 SV=1  
 Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Oryctolagus cuniculus GN=SHMT2 PE=1 SV=2  
 Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1A PE=1 SV=4  
 Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit OS=Bos taurus GN=PPP1CA PE=2 SV=1  
 Sialic acid synthase OS=Homo sapiens GN=NANS PE=1 SV=2  
 Sideroflexin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Sfxn3 PE=2 SV=1

PSB1\_MOUSE  
 PSB2\_RAT  
 PSB3\_BOVIN (+2)  
 PSB4\_HUMAN (+1)  
 PSB5\_HUMAN (+2)  
 PDIA3\_RAT  
 PDIA4\_MOUSE (+1)  
 PDIA6\_RAT  
 PDIA1\_RAT  
 K1967\_MOUSE  
 PACN2\_MOUSE (+1)  
 PRDBP\_HUMAN (+1)  
 LSM12\_BOVIN (+3)  
 PP1R7\_RAT  
 RCC2\_MOUSE  
 SET\_HUMAN (+2)  
 S61A1\_BOVIN (+5)  
 PIMT\_MOUSE (+1)  
 DHX15\_HUMAN (+2)  
 PYC\_BOVIN (+3)  
 ODPD\_MOUSE (+1)  
 ODPB\_RAT  
 KPVM\_MOUSE  
 RADI\_BOVIN (+4)  
 RAGP1\_MOUSE  
 G3BP1\_HUMAN (+1)  
 IQGA1\_MOUSE  
 RB11A\_BOVIN (+13)  
 RAB5C\_BOVIN (+5)  
 RAB7A\_CANFA (+4)  
 RAB8A\_CANFA (+5)  
 RENT1\_HUMAN (+1)  
 RFA1\_CHICK  
 RTN4\_RAT  
 GDIR1\_MOUSE  
 ROCK2\_MOUSE (+1)  
 RINI\_RAT  
 PRPS1\_BOVIN (+11)  
 RALY\_MOUSE  
 REF\_HEVBR  
 RUVB1\_HUMAN (+2)  
 RUVB2\_BOVIN (+1)  
 SAPS3\_HUMAN (+1)  
 SAFB1\_RAT  
 SEPT11\_MOUSE  
 SEPT2\_RAT  
 SEPT7\_BOVIN (+5)  
 SEPT9\_RAT  
 GLYM\_RABIT  
 2AAA\_HUMAN (+2)  
 PP1A\_BOVIN (+5)  
 SIAL\_HUMAN  
 SFXN3\_RAT