

---

# Proteine involviert in Membran- Strukturierung

Charakterisierung und Analyse von CurT, Tetraspanin-8  
und Claudin-7

---

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Fach Chemie

vorgelegt von

Lena Ahlswede

geboren in Stuttgart



Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fachbereich 09 – Chemie, Pharmazie, Geografie und Geowissenschaften

Department Chemie - Biochemie



Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von März 2016 bis Juni 2021 im Department Chemie - Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] durchgeführt.



# Danksagung



---

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IX
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biologische Membranen und Transmembranproteine.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau biologischer Membranen.....	1
1.1.2 Struktur und Faltung von Membranproteinen.....	4
1.2 Beeinflussung der Thylakoidmembran durch Proteine der CURT1-Familie.....	8
1.3 Die Tetraspanin-Superfamilie.....	9
1.4 Die Claudin-Superfamilie.....	10
1.4.1 Claudin-7 ein <i>tight junction</i> ausbildendes Protein.....	12
1.5 Ziele der Arbeit.....	13
<b>2 Material.....</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Puffer und Lösungen.....	15
2.3 Bakterienmedien.....	18
2.4 Antibiotika und Medienzusätze.....	18
2.5 Zellkulturmedien und Zusätze.....	18
2.6 Antikörper.....	19
2.7 Größenstandards.....	19
2.8 Kitsysteme.....	19
2.9 Bakterienstämme.....	20
2.10 Zelllinien.....	20
2.11 Enzyme und deren Puffer.....	21
2.12 Plasmidvektoren.....	21
2.13 Oligonukleotide.....	23
2.14 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.15 Laborgeräte.....	26
2.16 Programme.....	28
<b>3 Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3.1.2 Ortsspezifische Mutagenese – <i>QuickChange</i> PCR.....	30

---

3.1.3	<b>Agarosegelelektrophorese</b> .....	<b>31</b>
3.1.4	<b>DNA-Isolierung aus Agarosegelen</b> .....	<b>31</b>
3.1.5	<b>Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i></b> .....	<b>31</b>
3.1.5.1	Plasmidminipräparation mittels Kit .....	31
3.1.5.2	Plasmidminipräparationen mittels alkalischer Lyse .....	32
3.1.6	<b>DNA-Konzentrationsbestimmung</b> .....	<b>32</b>
3.1.7	<b>Restriktionsverdau von DNA</b> .....	<b>32</b>
3.1.8	<b>Ligation</b> .....	<b>33</b>
3.1.9	<b>Sequenzierung</b> .....	<b>33</b>
3.2	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.2.1	<b>Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>-Bakterien</b> .....	<b>34</b>
3.2.2	<b>Transformation kompetenter <i>E. coli</i>-Bakterien</b> .....	<b>34</b>
3.2.3	<b>Testexpression</b> .....	<b>35</b>
3.2.4	<b>Kultivierung von <i>E. coli</i>-Bakterien, Heterologe Expression</b> .....	<b>36</b>
3.3	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>37</b>
3.3.1	<b>Isolierung von CurT</b> .....	<b>37</b>
3.3.1.1	Zellaufschluss und Gewinnung der Membranfraktion .....	37
3.3.1.2	Solubilisation der Membran mit LDAO .....	37
3.3.1.3	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	37
3.3.2	<b>Isolierung von Tetraspanin-8</b> .....	<b>38</b>
3.3.2.1	Zellaufschluss und Gewinnung der Membranfraktion .....	38
3.3.2.2	Solubilisation der Membran mit DDM.....	39
3.3.2.3	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	39
3.3.3	<b>Isolierung von Claudin-7</b> .....	<b>40</b>
3.3.3.1	Zellaufschluss und Gewinnung der Membranfraktion .....	40
3.3.3.2	Solubilisation der Membran mit LDAO .....	40
3.3.3.3	Immobilisierte Affinitätschromatographie .....	40
3.3.4	<b>Entsalzung mittels PD10-Säule</b> .....	<b>42</b>
3.3.5	<b>Bestimmung der Protein-Konzentration</b> .....	<b>42</b>
3.3.5.1	Absorption bei $\lambda = 280$ nm.....	42
3.3.5.2	BCA-Assay .....	43
3.3.6	<b>SDS-Polyacrylamidgelelektrophores (PAGE)</b> .....	<b>44</b>
3.3.6.1	Coomassie-Färbung .....	44

---

---

3.3.7	Western Blot-Analyse und Immunodetektion.....	45
3.3.8	Trichloressigsäure (TCA)-Fällung von Proteinen.....	45
3.3.9	NaOH-Extraktion von Proteinen.....	46
3.3.10	DNase/Lysozym-Verdau .....	46
3.3.11	Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	46
3.3.12	SDS-Titration.....	47
3.3.13	Test auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Claudin-7-Monomeren ..	48
3.3.14	GALLEX-Experiment.....	49
3.3.15	Rekonstitution von CurT in DOPC/DOPG-Liposomen .....	51
3.3.16	Rekonstitution von Claudin-7 in DOPC-Liposomen.....	51
3.3.17	Diskontinuierlicher Saccharose-Gradient zur Überprüfung der Rekonstitution ...	53
3.4	Programme zur Strukturvorhersage von Proteinen .....	54
3.5	Biophysikalische Methoden.....	54
3.5.1	Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie.....	54
3.5.2	Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Assay .....	55
3.5.3	Zirkulardichroismus (engl.: <i>circular dichroism</i> , CD)-Spektroskopie.....	57
3.5.3.1	Messung einzelner CD-Spektren.....	59
3.5.3.2	Thermische Denaturierung von Claudin-7 und Claudin-7* .....	59
3.5.4	<i>Atomic force Microscopy</i> (AFM) .....	59
3.6	Dünnschichtchromatographie (DC) .....	61
3.7	Zellbiologische Methoden .....	63
3.7.1	Kultivierungsbedingungen .....	63
3.7.2	Passagieren von eukaryotischen Zellen .....	63
3.7.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	63
3.7.4	Kultivierung auf Deckgläschen und Fixierung von eukaryotischen Zellen.....	64
3.8	Fluoreszenzmikroskopie .....	64
4	Ergebnisse und Diskussion .....	65
4.1	<i>Slr0483</i> – ein CurT-ähnliches Protein.....	65
4.1.1	In Cyanobakterien ist die kurze Genvariante des <i>slr0483</i> konserviert.....	65
4.1.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung .....	66
4.1.2.1	CurT kann in diversen <i>E. coli</i> -Stämmen heterolog exprimiert werden .....	66
4.1.2.2	CurT kann mit LDAO aus der <i>E. coli</i> -Membran solubilisiert werden .....	68

---

---

4.1.2.3	CurT kann mit einer Ausbeute von 6,4 mg pro 2 L Expressionskultur erhalten werden.....	70
<b>4.1.3</b>	<b>CurT verändert die Form von Liposomen.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Herstellung und Reinigung von CurT-Fragmenten.....</b>	<b>72</b>
4.1.4.1	Die CurT-Fragmente können in <i>E. coli</i> heterolog exprimiert werden .....	74
4.1.4.2	Die Reinigung der CurT-Fragmente mittels IMAC muss weiter optimiert werden .....	74
<b>4.1.5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1.5.1	Die Expression und Reinigung von CurT und seinen Fragmenten konnte erfolgreich durchgeführt werden .....	77
4.1.5.2	CurT kann mit membrankrümmenden Eigenschaften aus <i>E. coli</i> gewonnen werden .....	79
<b>4.2</b>	<b>Tetraspanin-8.....</b>	<b>80</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung .....</b>	<b>80</b>
4.2.1.1	Tetraspanin-8 kann im <i>E. coli</i> -Stamm Tuner(DE3)pLysS heterolog exprimiert werden .....	80
4.2.1.2	Tetraspanin-8 kann mit DDM aus der <i>E. coli</i> -Membran solubilisiert werden .....	81
4.2.1.3	Tetraspanin-8 kann abhängig von der Inkubationszeit als Dimer, bzw. Monomer an der Ni-NTA-Agarose detektiert werden.....	83
4.2.1.4	Tetraspanin-8 kann in geringen Mengen mittels IMAC gereinigt werden	84
<b>4.2.2</b>	<b>Dimerisierung und Lokalisation von Tetraspanin-8 <i>in vivo</i> .....</b>	<b>86</b>
4.2.2.1	Ab 10 µM IPTG nimmt die Dimerisierung von Tetraspanin-8 mit der IPTG-Konzentration zu.....	86
4.2.2.2	Einzelmutationen von fünf Cystein-Seitenketten im Tetraspanin-8 führen nicht zu einer Veränderung der Dimerisierung.....	88
4.2.2.3	Einzelmutationen im Tetraspanin-8 führen zu einer geringfügig anderen Lokalisation in HEK293-Zellen .....	90
4.2.2.4	Die Mutation aller Palmitoylierungsstellen führt <i>in vivo</i> nicht zu einer veränderten Oligomerisierung.....	92
<b>4.2.3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.2.3.1	Tetraspanin-8 kann heterolog aus <i>E. coli</i> gewonnen werden .....	93
4.2.3.2	Die Oligomerisierung von Tetraspanin-8 wird nicht von den Palmitoylierungsstellen beeinflusst .....	94
4.2.3.3	Palmitoylierungen haben einen Einfluss auf die Lokalisation von Tetraspanin-8.....	95
<b>4.3</b>	<b>Claudin-7 .....</b>	<b>97</b>

---

---

<b>4.3.1</b>	<b>Dimerisierung und Lokalisation von Claudin-7 <i>in vivo</i> .....</b>	<b>97</b>
4.3.1.1	Die IPTG-Konzentration hat einen Einfluss auf die Expression von Claudin-7 .....	97
4.3.1.2	Claudin-7 konnte <i>in vivo</i> nicht an der Membran detektiert werden.....	98
<b>4.3.2</b>	<b>Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung .....</b>	<b>99</b>
4.3.2.1	Claudin-7 kann in diversen <i>E. coli</i> -Stämmen heterolog exprimiert werden .....	99
4.3.2.2	Claudin-7 kann mit LDAO aus der <i>E. coli</i> -Membran solubilisiert werden	101
4.3.2.3	Claudin-7 kann über IMAC gereinigt werden .....	102
4.3.2.4	Eine zusätzliche Reinigung über eine <i>Strep-Tactin</i> <sup>®</sup> -Säule erhöht den Reinheitsgrad von Claudin-7 nicht .....	103
<b>4.3.3</b>	<b>Betrachtung der Sekundärstruktur von Claudin-7 mittels CD-Spektroskopie .....</b>	<b>104</b>
4.3.3.1	Claudin-7 besitzt eine hauptsächlich $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur .....	104
4.3.3.2	Claudin-7 besitzt eine hohe thermische Stabilität.....	105
<b>4.3.4</b>	<b>GPC zur Bestimmung der Oligomergröße von Claudin-7.....</b>	<b>106</b>
4.3.4.1	Claudin-7 liegt in DDM-Mizellen als Monomer, Hexamer und in höheren Oligomeren vor .....	107
<b>4.3.5</b>	<b>SDS induzierte Entfaltung von Claudin-7 .....</b>	<b>108</b>
4.3.5.1	SDS hat einen Einfluss auf die Tryptophan-Umgebung von Claudin-7, jedoch nicht auf die Oligomerbildung.....	109
4.3.5.2	Der Einfluss von SDS führt zu einer Verschiebung des Tryptophan-Spektrums hin zu kleineren Wellenlängen .....	110
<b>4.3.6</b>	<b>Elektrostatische Wechselwirkungen führen zur Cluster-Bildung von Claudin-7 ..</b>	<b>111</b>
<b>4.3.7</b>	<b>Claudin-7 bildet Kopf-zu-Kopf Interaktion in Proteoliposomen aus .....</b>	<b>113</b>
4.3.7.1	DOPC-Liposomen können mit 6 mM LDAO destabilisiert werden .....	113
4.3.7.2	Claudin-7 kann erfolgreich in DOPC-Liposomen rekonstituiert werden .	114
4.3.7.3	Claudin-7 verknüpft <i>in vitro</i> Liposomen .....	116
<b>4.3.8</b>	<b>Rasterkraftmikroskopie (engl.: <i>Atomic force microscopy</i>, AFM) von Claudin-7 Membranen.....</b>	<b>118</b>
4.3.8.1	Claudin-7 Membranen unterscheiden sich deutlich von DOPC Membranen .....	118
4.3.8.2	Claudin-7 führt zur Vernetzung von Membranen .....	119
4.3.8.3	Claudin-7 vernetzt auch bei geringer Ionenstärke Membranen .....	120
4.3.8.4	Mittels AFM können Claudin-7-Oligomerringe detektiert werden .....	121
<b>4.3.9</b>	<b>Mutationen im Interaktionsbereich von Claudin-7.....</b>	<b>122</b>

---

---

4.3.9.1	Die <i>in vivo</i> Dimerisierung der Mutanten im GALLEX-Experiment unterscheidet sich nicht von Claudin-7 Wildtyp .....	123
4.3.9.2	Alle Mutanten lassen sich analog zum Claudin-7 Wildtyp reinigen .....	125
4.3.9.3	Betrachtung der Sekundärstruktur von Claudin-7 und dessen Mutanten mittels CD-Spektroskopie.....	126
4.3.9.4	Die SDS-induzierte Entfaltung der Mutanten unterscheidet sich nicht vom Wildtyp .....	128
4.3.9.5	Die Mutanten weisen unterschiedlich starke elektrostatische Wechselwirkungen auf.....	129
4.3.9.6	Die Kopf-zu-Kopf Interaktion ist bei Claudin-7* nicht beeinträchtigt .....	130
4.3.9.7	Eine Membranstapelung durch Claudin-7* konnte mittels AFM nachgewiesen werden .....	132
<b>4.3.10</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>134</b>
4.3.10.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen der Oligomerisierung und Lokalisation von Claudin-7 .....	134
4.3.10.2	Claudin-7 kann erstmals aus einer heterologen Expression in <i>E. coli</i> gewonnen werden .....	135
4.3.10.3	Claudin-7 besitzt eine hauptsächlich $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur und ist relativ stabil gegenüber Hitzedenaturierung .....	136
4.3.10.4	Claudin-7 liegt in Detergenzmizellen als Oligomer vor .....	138
4.3.10.5	Das Claudin-7 Oligomer ist stabil gegenüber dem Einfluss von SDS, es kommt jedoch zu einer Veränderung der Tryptophan-Umgebung .....	139
4.3.10.6	Die Claudin-7 Cluster-Bildung wird durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert .....	142
4.3.10.7	Rekonstituiertes Claudin-7 bildet in Proteoliposomen <i>trans</i> -Interaktionen aus .....	144
4.3.10.8	Die <i>trans</i> -Interaktion von rekonstituierten Claudin-7 konnte mittels Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden .....	145
4.3.10.9	Analyse der Claudin-7 Oligomerisierung durch gezielte Mutation von Aminosäure-Seitenketten .....	147
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>153</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>168</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	168
6.2	Tabellenverzeichnis.....	171
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	172
6.4	Weitere Themen, betreute Abschlussarbeiten und Forschungsmodule .....	176
6.5	Vektorkarten .....	176

---

---

<b>6.6</b>	<b>Zusätzliche Abbildungen.....</b>	<b>182</b>
6.6.1	Slr0482 – CurT-ähnliches Protein .....	182
6.6.2	Claudin-7 .....	186

---

## Zusammenfassung

Ein essenzieller Bestandteil einer Zelle ist die Biomembran, welche aus verschiedenen Lipiden und Membranproteinen besteht. Membranproteine besitzen eine Vielzahl an Strukturen und Funktionen. In dieser Arbeit wurden vier Membranproteine, aus unterschiedlichen Organismen stammend, heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und anschließend charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden zusammengefasst.

Das CurT-ähnliche Protein (im Folgenden CurT) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 induziert *in vitro* eine Krümmung von Liposom-Membranen. Das wildtypische Protein konnte in dieser Arbeit erfolgreich aus einer heterologen Expression in *E. coli* gewonnen werden. Die Ausbeute betrug dabei 6,4 mg pro 2 L Expressionskultur. Zudem konnte gezeigt werden, dass rekombinantes CurT Membrankrümmungen in DOPC/DOPG-Liposomen hervorruft. Des Weiteren konnten Fragmente von CurT erfolgreich heterolog exprimiert werden. Die Proteinreinigung dieser Fragmente benötigt weitere Untersuchungen zur Optimierung. Mit Hilfe dieser Fragmente sollen die Funktionen der einzelnen Domänen im CurT-Protein ermittelt werden.

Humanes Tetraspanin-8 ist ein Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie und klinisch relevant bei diversen Krebserkrankungen. In dieser Arbeit konnte Tetraspanin-8 erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert werden. Die *in vivo* Dimerisierung von Tetraspanin-8 konnte über das GALLEX-System nachgewiesen werden. Durch die Mutation der Cystein-Seitenketten an den Stellen C7 und C74 im Tetraspanin-8 wurde eine veränderte Lokalisation in HEK293 beobachtet.

Das humane Claudin-7 bildet *tight junctions* aus und gehört zur Claudin-Superfamilie. Mit Claudin-7 konnte erstmals ein Protein der Claudin-Superfamilie heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Die Ausbeute betrug 1,8 mg pro Liter Expressionskultur. Das rekombinante Claudin-7 besitzt eine hohe thermische Stabilität. Isoliert in Mizellen kann das humane Protein als Monomer, Hexamer und in Form verschiedener höhere Oligomere vorliegen. In Gegenwart des anionischen Detergenz Natriumlaurylsulfat (SDS) konnte keine Entfaltung des Proteins beobachtet werden, was auf eine hohe Stabilität der Struktur hinweist. Die Oligomerisierung von Claudin-7 in der Membran beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Des Weiteren konnte die Kopf-zu-Kopf-Interaktion zwischen Claudin-7-Proteinen nachgewiesen werden. Durch Mutationsanalyse konnten die Aminosäuren R81 und Y149 als relevant für die Oligomerisierung in der Membran identifiziert werden.



# 1 Einleitung

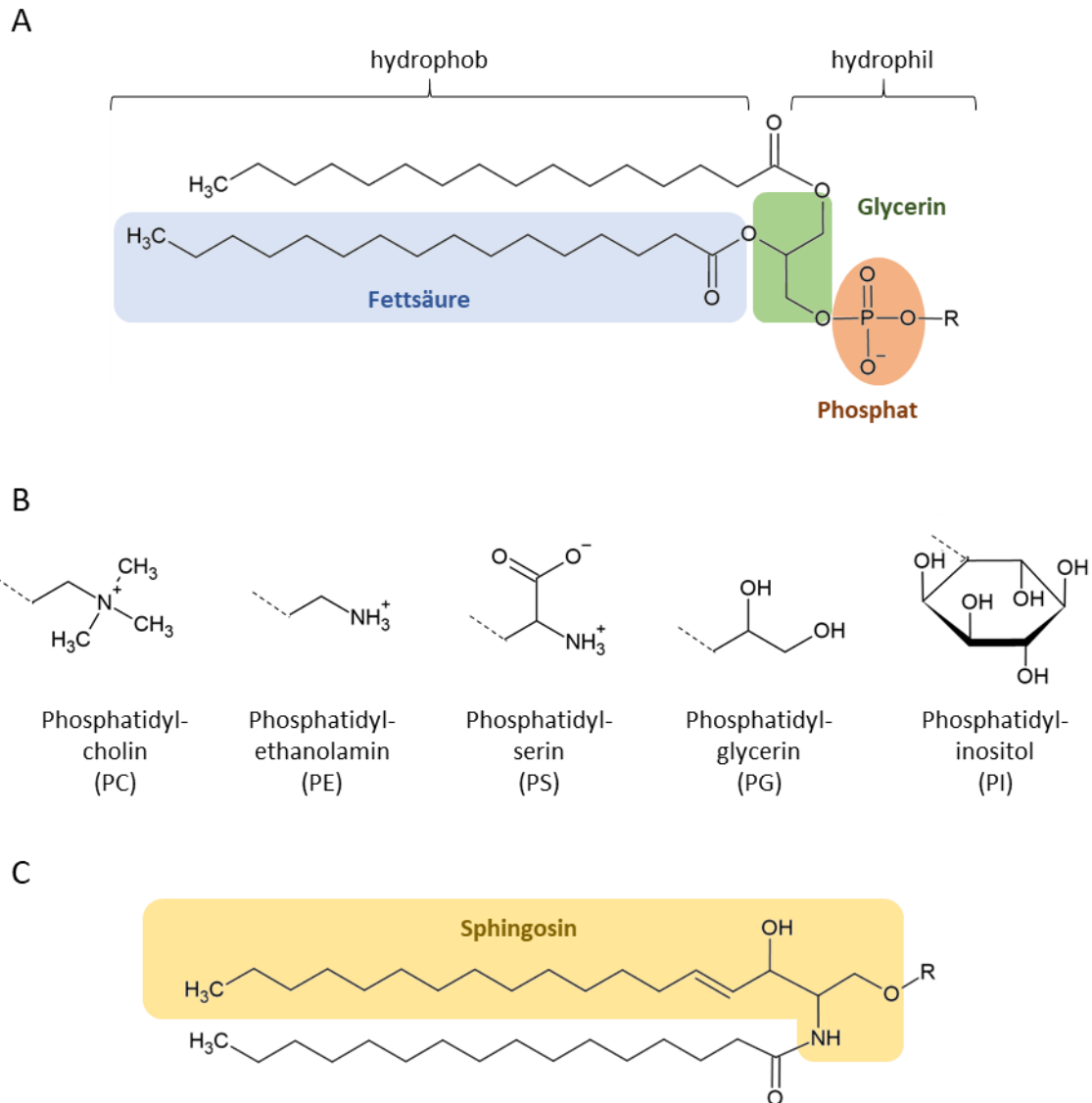
## 1.1 Biologische Membranen und Transmembranproteine

Biomembranen ermöglichen das Leben wie wir es heute kennen. Sie grenzen Reaktionsräume innerhalb von Zellen (Kompartimente) und auch die Zellen selbst gegen die Umgebung ab. Die Lipiddoppelschicht ist dabei undurchdringbar für größere und geladene Moleküle, während kleine lipophile Moleküle durch die Membran diffundieren können. Dadurch stellt die Membran eine selektive Barriere dar. Die Hauptbestandteile einer Membran sind dabei Lipide und Membranproteine [1]. Membranproteine ermöglichen einen selektiven Transport von Molekülen und Ionen, die Signalweiterleitung von extrazellulären Signalen, dienen der Weiterleitung eines elektrischen Potentials und sind wichtig für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Aus pharmazeutischer Sicht spielen Membranproteine eine wichtige Rolle, da etwa 60 % der vertriebenen Arzneimittel an Membranproteinen wirkt [2]. Membranproteine werden von etwa einem Drittel des menschlichen Genoms codiert [3]. Dahingegen machen die gelösten Strukturen von Membranproteinen nur 1 % der bisher gelösten Proteinstrukturen aus [4]. Um ein besseres Verständnis für die Funktion und Struktur von Membranproteinen zu erhalten, ist die Untersuchung dieser Proteine Gegenstand aktueller Forschung.

### 1.1.1 Aufbau biologischer Membranen

Biologische Membranen bestehen aus Lipiden und Membranproteinen. Eine Lipiddoppelschicht bildet das Grundgerüst der Membran [1]. Der darin enthaltene Proteinanteil variiert je nach Funktion und Lokalisation der Membran. Bei Lipiden handelt es sich um amphipathische Moleküle, welche einen hydrophoben Teil (Acyl-Ketten) und eine hydrophile Kopfgruppe besitzen [5]. In biologischen Membranen kommen dabei die Lipide Glycerophospholipide (Abbildung 1 A), Sphingolipide (Abbildung 1 C), Glycolipide und Sterine vor. Die Glycerophospholipide besitzen ein Glycerin-Rückgrat. Dieses ist an der C1- und C2-Position mit je einer Fettsäure verestert. Die Fettsäuren weisen in der Regel eine Kettenlänge von 10 bis 24 Kohlenstoffatomen auf. Es liegen sowohl gesättigte (meist an C1-Position) als auch ungesättigte Fettsäuren (meist an C2-Position) in Membranlipiden vor [6]. Natürlich vorkommende Fettsäuren weisen dabei meist eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen auf. Bei den Glycerophospholipiden befindet sich eine Phosphat-Gruppe am C3 des Glycerols. Dieses wird wiederum mit verschiedenen Alkoholen (Abbildung 1 B) verestert [1]. Die angefügten Reste bestimmen die Kopfgruppeneigenschaften des Lipids. Sphingolipide werden aus einem Sphingosin gebildet, welches über die Amid-Gruppe mit einer Fettsäure verestert ist. Über den an C1 gebundenen Sauerstoff kann die Kopfgruppe angefügt werden. Dabei können wie bei den

Glycerophospholipiden mit Phosphat verknüpfte Alkohole angefügt oder Zucker-Reste direkt glykosidisch gebunden werden [5]. Unter Glycolipide fallen alle Lipide, welche als Kopfgruppe einen Zucker-Rest aufweisen, der nicht durch eine Phosphatgruppe vernetzt ist. Die Sterine besitzen ein hydrophobes Sterin-Grundgerüst mit einer Hydroxy-Gruppe [7]. Damit weisen Sterine eine sehr kleine polare Kopfgruppe auf. Das Cholesterin ist im Menschen das wichtigste Sterin in biologischen Membranen [8].



**Abbildung 1: Struktur von Membranlipiden.**

(A) Aufbau eines Glycerophospholipids. Das Glycerin-Rückgrat (grün) wird mit zwei Fettsäuren (blau) verestert. Dabei bilden die Acyl-Ketten den hydrophoben Teil des Lipids. Der Phosphat-Rest (orange) wird am C3 mit einem Alkohol verestert und bildet die hydrophile Kopfgruppe. (B) Verschiedene Alkohole zur Veresterung von Glycerophospholipiden. Die gestrichelte Bindung stellt dabei die Bindung an den Sauerstoff des Phosphats dar. Der entsprechende Alkohol gibt dem Lipid den aufgeführten Namen inklusive der Abkürzung. (C) Aufbau eines Sphingolipids. Das Sphingosin-Rückgrat (gelb) wird über eine Amid-Bindung mit einer Fettsäure verestert. Über den C1-Sauerstoff wird die Kopfgruppe an das Sphingolipid angefügt.

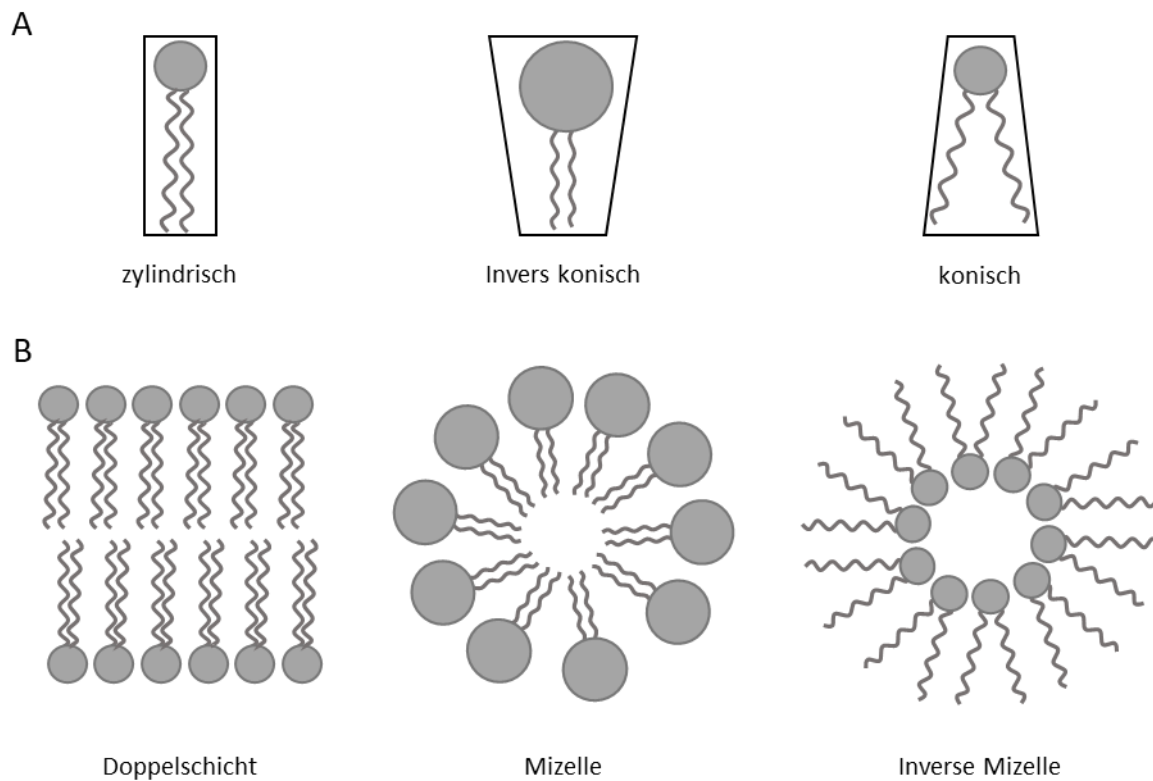
Die Lipid-Zusammensetzung der Membran unterscheidet sich dabei nicht nur zwischen den verschiedenen Zellarten, sondern auch in den unterschiedlichen Organellen [9]. Auch die beiden

Hälften der Lipiddoppelschicht können sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden [7]. Die *Escherichia coli* (*E. coli*)-Membran, als Beispiel für ein Bakterium besteht zu ca. 70 % aus Phosphatidylethanolamin (PE), 10 % Cardiolipin und 20 % weitere Glycerophospholipide [10]. Auffallend ist, dass die innere Mitochondrien-Membran eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweist. Dies unterstützt die Endosymbiontentheorie, wonach Mitochondrien bakteriellen Ursprungs sind [11]. Die Thylakoidmembran in Chloroplasten besteht dahingegen aus ca. 55 % Monogalactosyldiacylglycerin (MGDG), 25 % Digalactosyldiacylglycerin (DGDG), 10 % Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG) und 10 % Phosphatidylglycerin (PG) [12]. Die Membranzusammensetzung kann sich während eines Entwicklungszyklus verändern. Im Fall von *Plasmodium chabaudi* haben frühe Trophozoiten eine Zusammensetzung von 63 % Phosphatidylcholin (PC), 23 % Phosphatidylethanolamin (PE), 5 % Phosphatidylserin (PS), 5 % Phosphatidylinositol (PI) und 4 % Sphingomyelin (SM) [13]. Bei der Entwicklung zu späten Trophozoiten verändert sich die Lipidzusammensetzung zu 56 % PC, 26 % PE, 7 % PS, 7 % PI und 4 % SM [13]. Die Plasmamembran einer menschlichen Zelle besteht dagegen aus 34 % Cholesterin, 23 % PC, 17 % SM, 11 % PE, 8 % PS und 7 % sonstige Lipid-Bestandteile [14]. Diese diverse Zusammensetzung ist spezifisch für die Membranlokalisation. Je nach Lokalisation ergeben sich somit andere physikochemische Eigenschaften der Biomembran. Worauf diese beruhen wird im Folgenden beschrieben.

Die Form der Lipide wird aus dem Verhältnis der Querschnittsfläche der Acyl-Ketten und der Kopfgruppe bestimmt [15, 16]. Es gibt zylindrische Lipide wie Phosphatidylcholin, invers konische Lipide wie Polyphosphoinositole und konische Lipide wie Monogalactosyldiacylglycerin (Abbildung 2 A) [17]. Aufgrund des hydrophoben Effekts assemblieren Lipide abhängig von ihrer Form. Nur zylindrische Lipide bilden eine Lipiddoppelschicht aus [17]. Dabei richten sich die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Umgebung hin aus und es bildet sich ein hydrophober Kern (Acyl-Ketten). Der hydrophobe Kern hat im Durchschnitt einen Durchmesser von 3 nm [18]. Mit einem Durchmesser der Kopfgruppen von 1,5 nm ergibt sich eine Gesamtdicke der Lipiddoppelschicht von etwa 6 nm [18]. Diese ist jedoch stark von der Größe der Kopfgruppen, sowie der Länge der Acyl-Ketten abhängig. Invers konische Lipide bilden Mizellen mit einem hydrophoben Kern aus, während konische Lipide inverse Mizellen mit einem hydrophilen Kern ausbilden [17]. Diese Lipide werden aufgrund dessen als nicht Doppelschicht bildende Lipide bezeichnet [17]. In Kombination mit anderen Lipid-Formen können Lipiddoppelschichten ausgebildet werden.

Die Lipiddoppelschicht kann im Wesentlichen in zwei verschiedenen Phasen vorliegen [19]. Diese beruhen hauptsächlich auf der Konformation der Doppelbindungen der Acyl-Ketten. Unter der Phasenübergangstemperatur befindet sich die Lipiddoppelschicht in einer hochgeordneten Gel-Phase,

alle Doppelbindungen liegen in *trans*-Konformation vor, mit einer geringen lateralen Diffusion [19]. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur spricht man von der flüssig-kristallinen Phase, alle Doppelbindungen befinden sich in einer *gauche*-Konformation, wodurch sich eine erhöhte Fluidität ergibt [20].



**Abbildung 2: Lipidformen und Lipidaggregation.**

(A) Lipide können eine zylindrische, invers konische oder konische Form aufweisen. Die Form ergibt sich aus dem Verhältnis der Querschnittsflächen der Kopfgruppe und der Acyl-Ketten. (B) Die verschiedenen Lipidformen aggregieren zu Lipiddoppelschichten, Mizellen oder inversen Mizellen. Verändert nach [21].

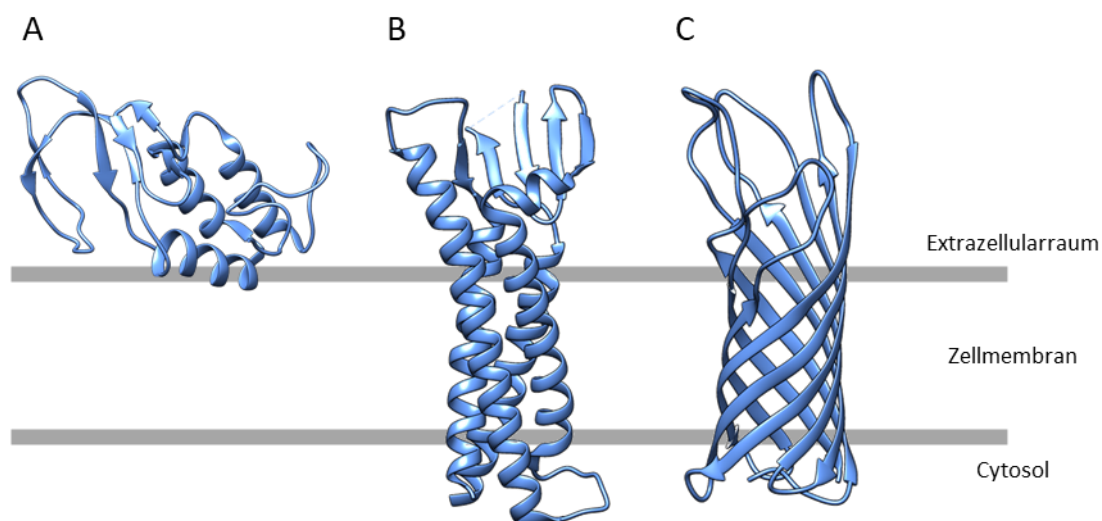
Durch die spezifische Zusammensetzung biologischer Membranen werden die Eigenschaften der Membran bestimmt. Die Ausbildung von Lipid-Domänen (*lipid-rafts*) in der Membran spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen, da sie die Funktion und Struktur von Membranproteinen beeinflussen können [22].

### 1.1.2 Struktur und Faltung von Membranproteinen

Man unterscheidet zwei Arten von Membranproteinen, periphere und integrale Membranproteine. Periphere Membranproteine assoziieren mit der Membran, durchdringen sie jedoch nicht vollständig. Die Assoziation kann über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder durch eine Verankerung in der Membran durch einen Protein- oder Lipidanker erfolgen. Ein Beispiel

für ein peripheres Membranprotein ist die Phospholipase A2 aus Bienengift (PDB-ID: 1POC, Abbildung 3 A). Im Gegensatz zu den peripheren Membranproteinen durchspannen integrale Membranproteine die Membran vollständig. Es gibt zwei unterschiedliche Arten der integralen Membranproteine. Die einen bilden  $\alpha$ -helikale Bündel in der Membran aus (Abbildung 3 B), die anderen bilden eine  $\beta$ -Fasstruktur aus (Abbildung 3 C) [23]. In beiden Fällen wird das komplette Wasserstoffbrückenpotential des Peptidrückgrats ausgenutzt [5]. Dies ermöglicht unter anderem die Insertion in die Membran mit ihrem hydrophoben Kern. Integrale Membranproteine zeigen eine erhöhte Tendenz zur Oligomerisierung [23].

Bei einem  $\beta$ -Fass bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen parallel oder antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern aus. Ein  $\beta$ -Fass besteht aus acht bis 24  $\beta$ -Faltblättern, welche sich zu einem Fass zusammenlagern [24]. In den  $\beta$ -Faltblättern einer  $\beta$ -Fasstruktur alternieren hydrophobe und hydrophile Aminosäuren. Die hydrophoben Aminosäuren weisen nach außen zur Lipiddoppelschicht hin, während die hydrophilen Aminosäuren ins Innere des Fasses ragen [25]. Membranproteine mit einer  $\beta$ -Fasstruktur kommen hauptsächlich in der äußeren Membran Gramnegativer Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten vor [26]. Ein Beispiel für ein  $\beta$ -Fass-Protein sind Porine. Diese unterstützen die Diffusion ungeladener gelöster Stoffe bis zu 60 Da [27].



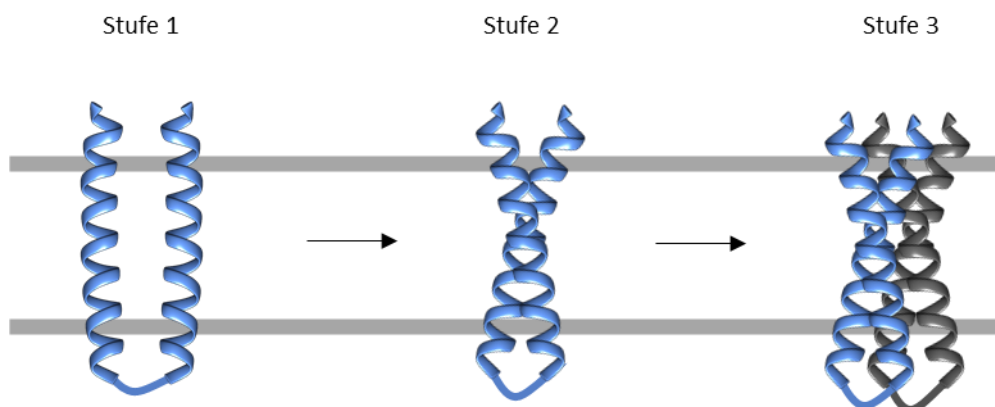
**Abbildung 3: Periphere und integrale Membranproteine.**

(A) Struktur des peripheren Membranproteins Phospholipase A2 aus Bienengift (PDB-ID: 1POC) [28]. (B) Struktur des  $\alpha$ -helikalen Membranproteins Claudin-15 (PDB-ID: 4P79) [29]. (C) Struktur des OmpA (*Outer membrane Protein A*) aus *E. coli* mit  $\beta$ -Fasstruktur (PDB-ID: 1BWX) [30].

Die meisten Membranproteine liegen nicht mit einer  $\beta$ -Fasstruktur vor, sondern besitzen eine  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne [18]. Bei der transmembranen  $\alpha$ -Helix handelt es sich um eine rechtsgängige Helix mit einer Länge von 20 bis 30 Aminosäuren [31, 32]. Damit sind Transmembranhelices deutlich länger als  $\alpha$ -helikale Strukturen in löslichen Proteinen, welche eine durchschnittliche Länge von zwölf Aminosäuren haben [32]. Das Wasserstoffbrückenpotential des

Peptidrückgrats wird bereits innerhalb der  $\alpha$ -Helix gesättigt, was die Stabilität der  $\alpha$ -Helix erhöht. Die Aminosäuren der Transmembranhelix sind hauptsächlich hydrophob. Auch polare Aminosäuren können in der Transmembranhelix vorkommen [25]. Diese sind wichtig für die Funktion des Proteins und können durch andere Aminosäure abgeschirmt werden. Auf der cytosolischen Seite einer Transmembranhelix sind häufig positive Aminosäure lokalisiert [33]. Dieser Einfluss auf die Orientierung der Helix wird als *positive inside rule* bezeichnet.

Die korrekte Faltung von Proteinen ist wichtig für deren Funktion. Während sich lösliche Proteine meist spontan nach der Synthese falten, ist die Faltung von Membranproteinen ein komplizierterer Prozess. Die Faltung von  $\alpha$ -helikalen Membranproteinen kann in einem drei Stufen-Modell beschrieben werden (Abbildung 4) [34]. Die erste Stufe beschreibt die Insertion der Transmembransegmente in die Membran und der spontanen Ausbildung der  $\alpha$ -Helix. Die Insertion der Helices in die Membran beruht darauf, dass durch die Assemblierung von hydrophoben Molekülen (Membran und Membranhelix) Wassermoleküle frei werden und es zu einer Erhöhung der Entropie kommt (hydrophoben Effekt). In der zweiten Stufe kommt es zur Assemblierung der Transmembranhelices und somit der Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins. Die dritte Stufe beschreibt die Ausbildung der Quartärstruktur in Form von oligomeren Komplexen oder die Bindung von Kofaktoren. Dieses Modell stellt nur eine Vereinfachung der Faltung von Membranproteinen dar, da häufig keine idealen Helices vorliegen. Es gibt sowohl halbe Helices als auch Helices parallel zur Ebene der Membran oder Helices mit einem Knick in ihrer Struktur. Die Bindung von Kofaktoren ist oft kein eigener Schritt, da sie zur Ausbildung der korrekten Faltung notwendig ist [35]. Die drei Schritte können für eine thermodynamische Betrachtung in weitere Stufen unterteilt werden [18]. Auch die Struktur der Membran und einzelne Lipide haben einen Einfluss auf die Faltung und Funktion von Membranproteinen.



**Abbildung 4: Das Drei-Stufen-Modell der Membranproteinfaltung.**

In Stufe 1 werden die  $\alpha$ -Helices einer Polypeptidkette aufgrund des hydrophoben Effekts in die Membran inseriert. In Stufe 2 assemblieren die Helices zur Tertiärstruktur des Proteins. Stufe 3 beschreibt die Assemblierung mit Kofaktoren oder die Oligomerisierung mit anderen Proteindomänen zur Quartärstruktur.

Die Assemblierung der  $\alpha$ -Helices zur Tertiärstruktur von Proteinen ist entropiegetrieben. Die Freiheitsgrade der Transmembranhelices nehmen ab, aber durch die Interaktion der Helices miteinander wird die Interaktion mit Membranlipiden reduziert. Dadurch erhöht sich die Zahl der Freiheitsgrade der Membranlipide, was zu einer erhöhten Entropie führt [36]. Somit ist die Assemblierung der Transmembranhelices begünstigt. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Assemblierung der Transmembranhelices ist die Wechselwirkung zwischen den Helices. Die Interaktion der Helices wird hauptsächlich durch van der Waals Kräfte stabilisiert [37]. In interagierenden Helices treten oft komplementäre Oberflächen auf (*knobs-into-holes-Modell*), wodurch sich diese perfekt zusammenlagern können [37, 38]. Das bekannteste Dimerisierungsmotiv ist ein GxxxG-Motiv [39]. Dabei steht G für die Aminosäure Glycin, welche aufgrund ihrer kleinen Seitenkette einen besonders engen Kontakt zwischen den Helices ermöglicht. Bei den drei Aminosäuren zwischen den Glycin-Aminosäuren, dargestellt durch x, kann es sich um beliebige Aminosäuren handeln. Durch die Struktur der  $\alpha$ -Helix (3,6 Aminosäuren pro Windung) befinden sich die beiden Glycin-Aminosäuren in direkter Nachbarschaft und eine enge Interaktion mit einer ähnlichen Helix ist bevorzugt. Auch elektrostatische Wechselwirkungen, wie polare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen sind bei Helix-Helix-Interaktionen zu beobachten [40]. Jedoch treten diese Interaktionen nur selten auf. Salz-Brücken können nachgewiesen werden [41], sind allerdings selten, da sie einen hohen energetischen Aufwand erfordern [42].

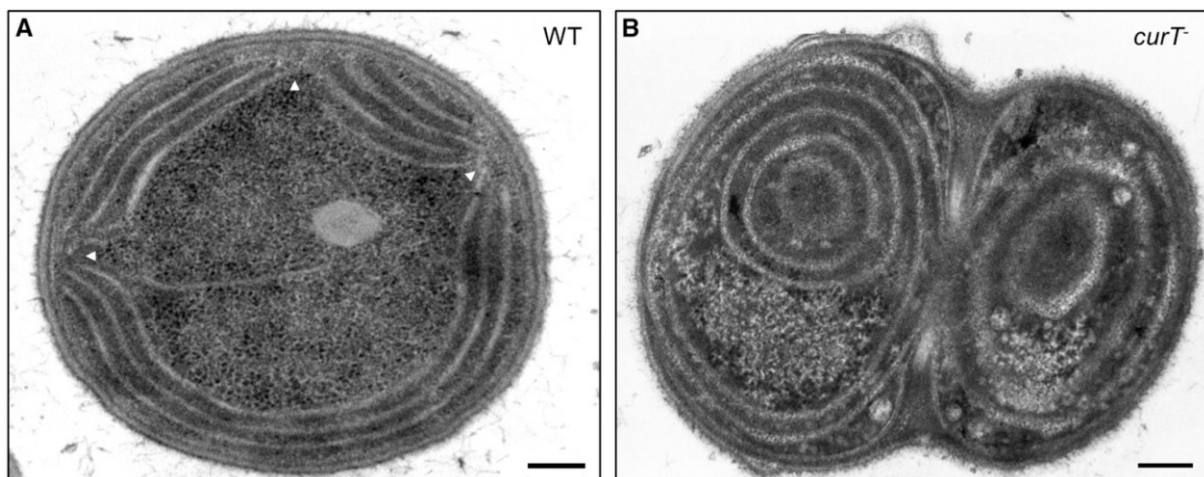
Durch die Länge der Acyl-Ketten wird die Dicke des hydrophoben Membrankerns bestimmt. Diese beeinflusst die Faltung von Membranproteinen, da es zu einem Unterschied in der Höhe des hydrophoben Bereichs zwischen dem Transmembranbereich des Proteins und der Lipiddoppelschicht kommen kann [43]. Um diese Diskrepanz auszugleichen, ist ein hoher energetischer Aufwand nötig [44]. Dabei kann es zu Strukturanpassungen im Protein kommen, welche einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben [45]. Aromatische Aminosäuren spielen ebenfalls eine Rolle bei der Faltung von Membranproteinen. Tryptophan kommt dabei besonders häufig im Übergangsbereich der Membran vor und kann als Lipidanker wirken, um die hydrophobe Diskrepanz auszugleichen [46–48].

Die Faltung von Membranproteinen ist ein komplexer und für jedes Protein spezifischer Prozess, der noch nicht vollständig verstanden und somit Gegenstand aktueller Forschung ist.

## 1.2 Beeinflussung der Thylakoidmembran durch Proteine der CURT1-Familie

Die Thylakoidmembran ist die hochspezialisierte Membran der Photosynthese in den Chloroplasten von Pflanzen [49] und in Cyanobakterien [50]. Die Anordnung der Thylakoidmembran zwischen Pflanzen und Cyanobakterien unterscheidet sich. In den Chloroplasten der Pflanzen bilden sich Thylakoidmembranstapel aus, welche Grana genannt werden [51]. Dahingegen gibt es in Cyanobakterien eine Vielzahl an verschiedenen Anordnungen der Thylakoidmembran, wie z.B. die parietale oder fasciculare Anordnung [52]. Die Thylakoidmembran besteht aus den Lipiden Monogalactosyldiacylglycerin (50 %, MGDG), Digalactosyldiacylglycerin (30 %, DGDG), Sulfoquinovosyldiacylglycerin (5-12 %, SQDG) und Phosphatidylglycerin (5-12 %, PG) [53]. Diese Zusammensetzung ist aufgrund des Hauptbestandteils MGDG besonders, da dieses allein keine lamellaren Membranen ausbilden kann [54].

Armbruster *et al.* [55] konnten die CURT1-Transmembranproteinfamilie in *Arabidopsis thaliana* an den Grana Rändern nachweisen. Zusätzlich konnte *in vitro* eine Krümmung der Membran durch Proteine der CURT1-Proteinfamilie nachgewiesen werden. Die CURT1-Proteinfamilie ist in Pflanzen und Cyanobakterien konserviert. Dies wurde durch die Substitution des endogenen CurT-Proteins in *Synechocystis* sp PCC 6803 (im Folgenden *Synechocystis*) bewiesen [55]. In *Synechocystis* ist CurT hauptsächlich in den Regionen, welche sich zur Plasmamembran krümmen, vorhanden [56]. Bei einer Deletion von CurT in *Synechocystis* ist eine deutlich veränderte Morphologie der Thylakoidmembran zu beobachten (Abbildung 5) [56]. Des Weiteren ist nach Heinz *et al.* [57] CurT bei der osmotischen Stresstoleranz wichtig.

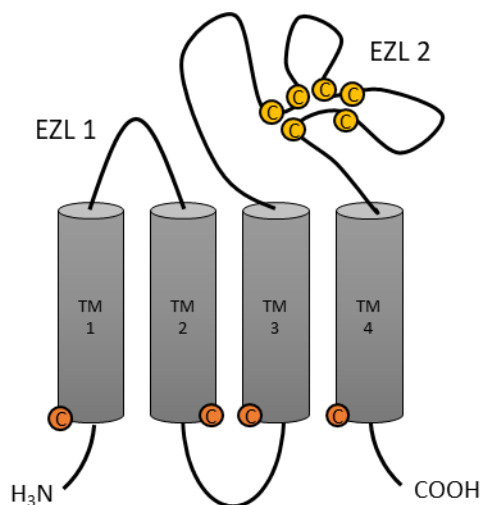


**Abbildung 5: Morphologie von *Synechocystis* Wildtyp (A) im Vergleich zu einer CurT-defiziten (*curT*<sup>-</sup>) Variante (B).** Abgebildet sind Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen einer *Synechocystis*-Zelle (A) und einer *Synechocystis*-Zelle welche CurT-defizient ist (*curT*<sup>-</sup>, B). Die weißen Pfeile weisen auf Bereiche mit hoher Membrankrümmung in der wildtypischen Zelle hin. Die Maßstabsanzeige entspricht 200 nm. Verändert nach [56].

Die CURT1-Proteine besitzen zwei Transmembranhelices sowie eine N-Terminale amphipathische Helix, die für die Induktion der Membrankrümmung verantwortlich sein soll. Die C-terminale Helix hingegen interagiert vermutlich mit anderen Proteinen. Beide Termini befinden sich im Cytosol der Cyanobakterien bzw. Stroma der Chloroplasten [58].

### 1.3 Die Tetraspanin-Superfamilie

Die Tetraspanin-Superfamilie ist eine Proteinfamilie mit 33 Mitgliedern in Säugetieren [59, 60]. Es handelt sich um kleine Membranproteine (20 – 30 kDa) [61]. Die Mitglieder der Familie zeichnen sich durch gemeinsame strukturelle Eigenschaften aus. Eine schematische Darstellung der Tetraspanin-Struktur ist in Abbildung 6 dargestellt. Tetraspanin-Proteine besitzen kurze cytosolische N- und C-Termini [62]. Dazwischen befinden sich vier Transmembranhelices welche durch einen kurzen extrazellulären Loop 1, einen kurzen intrazellulären Loop und einen langen extrazellulären Loop 2 verbunden sind [63]. Besonders der lange extrazelluläre Loop 2 beinhaltet die für Tetraspanin-Proteine typischen Merkmale. Dort sind vier, sechs oder acht Cysteine lokalisiert, welche Disulfid-Brücken ausbilden und somit die Struktur dieser Domäne stabilisieren [64]. Des Weiteren kann der lange extrazelluläre Loop in zwei Bereiche unterteilt werden. Zum einen in eine konstante Region und zum anderen in eine variable Region. Die konstante Region soll bei der Dimerisierung von Tetraspanin-Proteinen eine wichtige Rolle spielen, während die variable Region für Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig zu sein scheint [65]. Die konservierten intrazellulären Cystein-Seitenketten liegen meist palmitoyliert vor [66]. Die Palmitoylierung ist für die Funktion, Lokalisation und Interaktion mit anderen Proteinen bedeutend [67].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Tetraspanin-Struktur.**

Sekundärstruktur von Tetraspanin-Proteinen. C: Cystein-Seitenketten (orange: potentielle Palmitoylierungsstellen, gelb: Ausbildung von Disulfid-Brücken), EZL 1: Extrazellulärer Loop 1, EZL 2: Extrazellulärer Loop 2, TM 1-4: Transmembranhelix 1 bis 4.

Tetraspanin-Proteine spielen eine Schlüssel-Rolle bei der Steuerung des Transports und der Funktion von anderen Transmembranproteinen [63]. Dazu organisieren sie diese in sogenannten Tetraspanin angereicherten Microdomänen (engl.: *Tetraspanin enriched microdomains*, TEM) in der Membran [68]. Zu den Interaktionspartnern zählen dabei Integrine [69], Proteine der Immunglobulin-Superfamilie [70], Proteoglycane [71], G-Protein gekoppelte Rezeptoren [72], Claudin-Proteine [73] und weitere Proteine [61, 66, 71]. Auch Lipide sind bei der Organisation in TEMs von Bedeutung. So konnte eine Interaktion von Tetraspanin-Proteinen mit Cholesterin und Gangliosiden beobachtet werden [74]. In der Kristallstruktur des Tetraspanins CD81 konnte sogar eine Cholesterin-Bindetasche nachgewiesen werden [75]. Tetraspanin-Proteine haben einen Einfluss auf die Zell-Adhäsion und Signaltransduktion [76]. Des Weiteren konnte eine wichtige Funktion der Tetraspanin-Proteine im Gehör [77], dem Immun- [78], Urogenital- [79] und Reproduktionssystem [80] nachgewiesen werden.

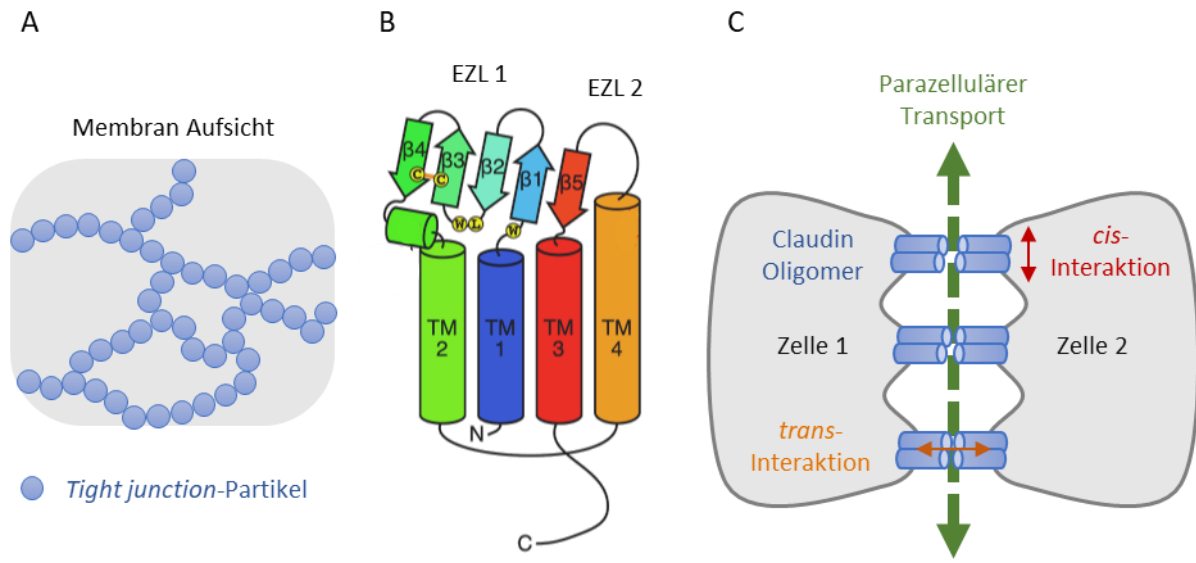
Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen und Interaktionen spielen Tetraspanin-Proteine eine wichtige Rolle bei verschiedensten Krankheiten [62, 68, 81]. Dabei fällt auf, dass die Tetraspanin-Proteine bei Krebs-Erkrankungen unterschiedliche Rollen einnehmen. So wirken die Tetraspanin-Proteine CD9 und CD82 als Metastase-Suppressoren während CD151 und Tetraspanin-8 (auch CO-029, TM4SM3) die Metastasenbildung unterstützen [66, 68]. Für Tetraspanin-8 konnte bereits eine Rolle bei Hirntumoren [82], Magenkrebs [83], Darmkrebs [84] und Prostatakrebs [85] nachgewiesen werden. Einzelmutationen im Tetraspanin-8 Gen stehen des Weiteren mit bipolaren Störungen und Schizophrenie in Verbindung [86].

## 1.4 Die Claudin-Superfamilie

*Tight junctions* fungieren in Epithel oder Endothelzellen als verknüpfende Einheit und führen damit zu einer Polarisation der Zellen [87]. Die Zelle wird in eine apikale und basale Seite mit unterschiedlichen Eigenschaften differenziert [88]. *Tight junctions* bestehen neben dem Hauptbestandteil des Claudin-Oligomers aus verschiedensten Proteinen, wie Occludin und Gerüst-Proteinen (z.B. ZO-1, ZO-2) zur Verknüpfung des Cytoskeletts mit der *tight junction* [89, 90]. Diese *tight junction*-Partikel oligomerisieren anschließend zu Strängen (vgl. Abbildung 7 A) welche sowohl als Barriere, als auch als Kontrolleure über den parazellulären Transport wirken [91].

Als Hauptbestandteile der *tight junctions* kommt den Claudin-Proteinen eine besondere Bedeutung zu. Die Claudin-Superfamilie hat 27 Mitglieder in Säugetieren [92]. Im Menschen sind jedoch nur 23 Claudin-Proteine vertreten [93]. Dabei handelt es sich um kleine Membranproteine mit einer Masse von 20 - 35 kDa [94]. Sie besitzen vier Transmembranhelices [95, 96]. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind cytosolisch lokalisiert [97]. Eine schematische Darstellung der Claudin-Struktur ist in Abbildung 7 B abgebildet. Der N-Terminus ist nur wenige Aminosäuren lang, während der

C-Terminus eine variable Länge aufweist [93]. Der C-Terminus besitzt eine PDZ-Bindedomäne zur Interaktion mit anderen *tight junction*-Proteinen [98]. Des Weiteren besitzt der C-Terminus mögliche Phosphorylierungs- und Palmytoilierungsstellen [93]. Claudin-Proteine besitzen einen großen extrazellulären Loop 1 (EZL 1) und einen zweiten kleinen extrazellulären Loop 2 (EZL 2) [99]. EZL 1 enthält neben einer potenziellen Disulfidbrücke eine hoch konservierte Konsenssequenz (W-L-WC-C) [100]. Die beiden extrazellulären Loops bilden die  $\beta$ -Faltblatt-Kopfgruppe des Claudin-Proteins aus.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Claudin-Struktur und Funktion.**

(A) Oligomerisierung von *tight junction*-Partikeln (blau) in Strängen, zur Versiegelung der Zellen. (B) Sekundärstruktur von Claudin-Proteinen. Verändert nach [100]. Zwischen den Cystein-Seitenketten auf  $\beta 3$  und  $\beta 4$  befindet sich eine Disulfid-Brücke (orange Linie). Die Konsenssequenz ist mit gelben Kreisen dargestellt. N: N-Terminus, C: C-Terminus, EZL 1: Extrazellulärer Loop 1, EZL 2: Extrazellulärer Loop 2, TM1-4: Transmembranhelix 1 bis 4,  $\beta 1$ -5:  $\beta$ -Faltblattstränge 1 bis 5. (C) Schematische Darstellung der Claudin-Interaktion und Funktion. Die Oligomerisierung der Claudin-Proteine in der Membran wird als *cis*-Interaktion bezeichnet. Durch die Interaktion der Kopfgruppen von Claudin-Oligomeren kommt es zur Verknüpfung mit der benachbarten Zelle (*trans*-Interaktion). Dabei kann eine Pore zum parazellulären Transport ausgebildet werden.

Claudin-Proteine können auf zwei Arten miteinander interagieren. Zum einen in der Ebene der Membran (*cis*-Interaktion) und zum anderen mit Claudin-Proteinen in der Nachbarzelle (*trans*-Interaktion) [101]. Diese Interaktionen sind in Abbildung 7 C dargestellt. Es werden zwei Gruppen von Claudin-Proteinen aufgrund Ihrer Eigenschaften der *trans*-Interaktion unterschieden [102]. So können durch die Interaktion Poren gebildet werden, welche eine Ladungs-Spezifität aufweisen, während andere Claudin-Proteine eine Barriere ausbilden [91]. Die Ladungsspezifität wird durch Aminosäure-Seitenketten des EZL 1 bestimmt [96]. Dadurch ermöglichen Claudin-Proteine parazellulären Transport durch den *tight junction*-Gürtel. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von mClaudin-15 sind weitere Einblicke in die Interaktion zwischen Claudin-Proteinen möglich geworden [29].

### 1.4.1 Claudin-7 ein *tight junction* ausbildendes Protein

Claudin-7 ist ein 211 Aminosäure (22,4 kDa) großes humanes Protein der Claudin-Superfamilie. Im Sammelrohr der Niere [103], den Atemwegen [104], dem Darm [105] und den Nebenhoden [106] wird Claudin-7 auf der basolateralen Seite der Epithelzellen exprimiert. In den Nebenhoden konnte keine Organisation in *tight junction*-Strängen beobachtet werden [106]. Eine direkte Interaktion konnte zwischen Claudin-7 und dem Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM nachgewiesen werden [107]. Durch Palmitoylierung von Claudin-7 wird dieses in mit Glycolipid angereicherte Membranmikrodomänen lokalisiert, wo die Interaktion mit EpCAM stattfindet [108]. Claudin-7 bildet eine intrazelluläre Pore aus. Die Selektivität dieser Pore wird noch diskutiert, da sowohl Nachweise für eine Cl<sup>-</sup>-Pore [109], als auch für eine Na<sup>+</sup>-Pore [110, 111] erbracht wurden.

Claudin-7 weist in diversen Krebsarten eine gestörte Expression auf. Dabei konnten sowohl eine gesteigerte als auch eine fehlende oder verminderte Expression beobachtet werden (für Beispiele siehe [112]). Claudin-7 wird normalerweise nicht in Hepatocyten exprimiert [113], somit kann die starke Expression bei Leberkarzinomen als Marker dieser verwendet werden [114]. Auch in Eierstockkrebs konnte eine vermehrte Expression von Claudin-7 beobachtet werden [115]. Ein Beispiel für eine verminderte Claudin-7 Expression ist der Brustkrebs, sobald dieser invasiv wird ist keine Claudin-7 Expression mehr zu beobachten [116]. Für Lungenkrebs konnte dasselbe nachgewiesen werden, bzw. bei einer geringen Expression von Claudin-7 konnte eine verminderte Migration der Krebszellen beobachtet werden [117].

## 1.5 Ziele der Arbeit

Membranproteine sind ein essenzieller Bestandteil von Biomembranen. Sie sind sowohl für den Transport von Molekülen und Ionen als auch für die Signalweiterleitung von extrazellulären Signalen wichtig. Des Weiteren wirken sie bei der Weiterleitung von elektrischen Potentialen mit. Auch der Kontakt zwischen Zellen wird durch Membranproteine vermittelt. Jedoch ist die Struktur, Faltung und Funktion vieler Membranproteinen bisher nur wenig verstanden und deswegen Fokus aktueller Forschung. Die heterologe Expression in *E. coli* ermöglicht es große Proteinmengen kostengünstig herzustellen. Ausreichend Protein ermöglicht wiederum eine genauere Untersuchung der Funktion und Struktur des Proteins. In dieser Arbeit sollte für vier Membranproteine, die heterologe Expression in *E. coli* etabliert und darauf aufbauend weiterführende Untersuchungen zur Struktur und Funktion durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Membranproteine sind im Folgenden mit ihrem Ursprungsorganismus dargestellt:

### I. CurT aus *Synechocystis* sp PCC 6803

Das Protein CurT aus *Synechocystis* sp PCC 6803 ist *in vivo* in der Thylakoidmembran in stark gekrümmten Bereichen lokalisiert [56]. Das Protein sollte in *E. coli* heterolog exprimiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Anschließend sollten die membrankrümmenden Eigenschaften *in vitro* untersucht werden. Zusätzlich sollten unterschiedliche Fragmente des Proteins zur genaueren Funktionsanalyse hergestellt werden.

### II. Humanes Tetraspanin-8

Tetraspanin-Proteine haben eine Vielzahl an Funktionen. Für Tetraspanin-8 konnte sowohl ein Einfluss bei der Entwicklung verschiedener Krebsarten [66, 68] als auch bei anderen Krankheiten [86] nachgewiesen werden. Zu einem besseren Verständnis der Funktion und Struktur von Tetraspanin-8 sollte dieses *in vitro* und *in vivo* genauer charakterisiert werden. Mittels Mutationsanalyse sollte der Einfluss von Palmitoylierungen auf die Lokalisation und Dimerisierung untersucht werden.

### III. Humanes Claudin-7

Claudin-7 ist ein *tight junction*-bildendes Protein der Claudin-Superfamilie. Die Oligomerisierung von Claudin-Proteinen ist Diskussion der aktuellen Forschung. In dieser Arbeit sollte die Struktur und Homooligomerisierung von Claudin-7 *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Dazu sollte das Protein heterolog in *E. coli* exprimiert und ein Reinigungs-Protokoll etabliert werden. Anschließend sollten mittels Mutationsanalyse sowie biochemischer und biophysikalischer Methoden die Struktur und Oligomerisierung, in der Membran (*cis*) und zwischen den Kopfgruppen (*trans*), analysiert werden.



## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (jetzt Merck, Darmstadt) oder Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, USA) bezogen. Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders deklariert, mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) angesetzt und bei Bedarf filtriert, sterilfiltriert oder autoklaviert. Die Phospholipide und fluoreszenzmarkierten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) bezogen.

### 2.2 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien.

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>AFM</b>	
Spülpuffer	50 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Agarosegelelektrophorese</b>	
6x Auftragspuffer	50 % Glycerin (v/v) 0,2 % Bromphenolblau (w/v) 0,2 % Xylencyanol (w/v)
TAE-Puffer	400 mM Tris 200 mM Essigsäure 10 mM EDTA
<b>GALLEX</b>	
5x Z-Puffer	300 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 200 mM Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O 50 mM KCl 5 mM MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
1x Z-Puffer	20% 5x-Z-Puffer (v/v) 0,27% β-Mercaptoethanol (v/v)
<b>Plasmidminipräparation</b>	
P1-Puffer	50 mM Tris/HCl 10 mM EDTA (pH 8,0) 100 µg/mL RNase
P2-Puffer	200 mM NaOH 1 % SDS
P3-Puffer	3 M KAc (pH 5,5)
<b>Proteinreinigung</b>	
N-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 100 mM NaCl

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
P-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 300 mM NaCl 10 % Glycerin
Puffer A	50 mM Tris (pH 8) 150 mM NaCl 10 % Glycerin
Puffer B	50 mM Tris (pH 8) 150 mM NaCl
SE-Puffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,2 % LDAO (w/v) 2,5 mM Desthiobiotin
SR-Puffer	100 mM Tris (pH 8) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA
SW-Puffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,2 % LDAO (w/v)
<b>SDS-PAGE</b>	
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris 2 M Glycerin 1 % SDS
5x Probenpuffer	250 mM Tris (pH 6,8) 10 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 175 mM DTT
5x Probenpuffer ohne SDS und DTT	250 mM Tris (pH 6,8) 0,2 % Bromphenolblau 50 % Glycerin
Coomassie-Entfärbelösung	30 % Ethanol 2 % Phosphorsäure
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie R250 40 % Ethanol 2 % Phosphorsäure
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % SDS
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4 % SDS

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Test auf elektrostatische Wechselwirkungen</b>	
S2-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 300 mM NaCl
S3-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 200 mM NaCl
S4-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 150 mM NaCl
S5-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 100 mM NaCl
S6-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 75 mM NaCl
S7-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 50 mM NaCl
S8-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 25 mM NaCl
S9-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8) 10 mM NaCl
S10-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8)
<b>Western Blot</b>	
10x TBS-Puffer	200 mM Tris (pH 7,8) 1,8 M NaCl
Blockpuffer	5 % Milchpulver in TBST
ECL1	9 mL VE-H <sub>2</sub> O 1 mL Tris (500 mM, pH 8,0) 100 µL Luminol (250 mM DMSO) 44 µL Cumarsäure (50 mM in DMSO)
ECL2	9 mL H <sub>2</sub> O 1 mL Tris (500 mM, pH 8,0) 5,5 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%)
TBST	10 % 10x TBS-Puffer 500 µL Tween 20
Transfer-Puffer	25 mM Tris 0,192 M Glycerin 30 % Methanol
<b>Zellkultur</b>	
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	0,1 M NaCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl pH 7,4

## 2.3 Bakterienmedien

Die verwendeten Bakterienmedien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2:** Verwendete Bakterienmedien.

Medium	Zusammensetzung
TSB-Medium	10 % PEG 4000 (w/v) 5 % DMSO (v/v) 2 % 1 M MgCl <sub>2</sub> (v/v) 1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 0,5 % NaCl (w/v)
LB-Agar	1,5 % Agar (w/v) 1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v)
LB-Medium	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v)

## 2.4 Antibiotika und Medienzusätze

Die verwendeten Antibiotika und Medienzusätze sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Verwendete Antibiotika und Medienzusätze.

Antibiotikum/Zusatz	Stammlösung
Ampicillin	100 mg/mL in 50 % EtOH (v/v)
Chloramphenicol	30 mg/mL in EtOH
Kanamycin	30 mg/mL in H <sub>2</sub> O
Tetrazyklin	6,25 mg/mL in EtOH
IPTG	1 M in H <sub>2</sub> O

## 2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Verwendete Zellkulturmedien und deren Zusätze.

Substanz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagles' Medium	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt
Geneticin (G418-Sulfat)	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt

## 2.6 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Art	Verdünnung	Hersteller
His Tag® <i>Monoclonal Antibody</i>	Monoklonal (Maus)	1:10 000	Novagen (Merck Millipore), Darmstadt
pAb anti-LexA <i>DNA Binding Region</i>	Polyklonal (Kaninchen)	1:1 000	Novus Biologicals, Wiesbaden
<i>Anti-rabbit IgG HRP</i>	Polyklonal (Ziege)	1:10 000	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt

## 2.7 Größenstandards

Die verwendeten Größenstandards sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Verwendete Größenstandards.

Größenstandard	Auftragsvolumen	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	6 µL	New England Biolabs, Frankfurt
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder	6 µL	New England Biolabs, Frankfurt
Pierce™ Unstained Protein MW Marker	2,5-5 µL	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	2,5-5 µL	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA

## 2.8 Kitsysteme

Die verwendeten Kitsysteme sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** Verwendete Kitsysteme.

Kitbezeichnung	Hersteller
<b>Gelelution</b>	
Gel/PCR DNA Fragments Kit	Geneaid, New Taipei City, Taiwan
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
<b>Minipräparation</b>	
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, New Taipei City, Taiwan
NucleoSpin Plasmid, Mini kit for Plasmid DNA	Macherey-Nagel, Düren
<b>BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA

## 2.9 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Verwendete *E. coli*-Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Bakteriengenotyp
BL21(DE3)	<i>F ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> λ(DE3)
BL21(DE3)pLysE	<i>F ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)pLysE (Cam <sup>R</sup> )
BL21(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)pLysS (Cam <sup>R</sup> )
BL21-gold(DE3)	<i>F dcm<sup>+</sup> Hte ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> (Tet <sup>R</sup> )
C43(DE3)	<i>F ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)
Clear Coli® BL21(DE3)	<i>F ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lon</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) <i>msbA148 ΔgutQΔkdsD ΔlpxLΔlpxMΔpagPΔlpxPΔeptA</i>
HMS174(DE3)pLysS	<i>F recA1 hsdR</i> (rK <sub>12</sub> <sup>-</sup> mK <sub>12</sub> <sup>+</sup> ) (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> )
Origami2(DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galk rpsL</i> F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
Origami2(DE3)pLysS	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galk rpsL</i> F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> pLysS (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
Rosetta2(DE3)	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )
Rosetta2(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cam <sup>R</sup> )
Rosetta-gami2(DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galk rpsL</i> (DE3) F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE2 (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
Rosetta-gami2(DE3)pLysS	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galk rpsL</i> (DE3) F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB</i> pLysSRARE2 (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
SU101	<i>lexA71::Tn5</i> (def) <i>sulA211 ΔlacI</i> (POZYA) 169/F' <i>lac<sup>q</sup> lacΔM15::Tn9</i>
Tuner(DE3)	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)
Tuner3(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i>

## 2.10 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp
HEK 293	Human embryonic kidney cells
HeLa	Human cervix epitheloid carcinoma
L Cells (ATCC® CRL-2648™)	Mauszelllinie, Fibroblasten, I. Bellinghausen (AG Saloge, Mainz, ursprünglich P. Garrone, Schering-Plough, Dradilly, Frankreich)

## 2.11 Enzyme und deren Puffer

Die verwendeten Enzyme mit verwendetem Puffer sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** verwendete Enzyme und deren Puffer.

Enzym	Verwendeter Puffer	Hersteller
AgeI	CutSmart®	NEB, Frankfurt a.M.
BamHI	CutSmart®	NEB, Frankfurt a.M.
EcoRI	NEBuffer™ 2.1	NEB, Frankfurt a.M.
HindIII	NEBuffer™ 2.1	NEB, Frankfurt a.M.
MluI	NEBuffer™ 3.1	NEB, Frankfurt a.M.
NheI	CutSmart®	NEB, Frankfurt a.M.
NsiI	NEBuffer™ 3.1	NEB, Frankfurt a.M.
Phusion®-HF DNA Polymerase	5x HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNAse		Sigma-Aldrich, Steinheim
SspI	NEBuffer™ 2.1	NEB, Frankfurt a.M.
T4 DNA Ligase	10x T4 DNA Ligase Puffer	NEB, Frankfurt a.M.
XbaI	CutSmart®	NEB, Frankfurt a.M.

## 2.12 Plasmidvektoren

Die verwendeten Plasmidvektoren sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11:** Verwendete Plasmidvektoren.

Vektor	Resistenz	Referenz
pcDNA3.1_Cln7_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1_TSPAN8_C232A_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1_TSPAN8_C74A_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1_TSPAN8_C75A_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1_TSPAN8_C7A_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1_TSPAN8_C83A_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1_TSPAN8_mCherry	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1+TrkA+Linker+mCherry	Ampicillin	Kalina Hristova, Johns Hopkins University, Whiting School of Engineering, Baltimore, MD (USA)
pcDNA3.1+TrkA+Linker+mTurq	Ampicillin	Kalina Hristova, Johns Hopkins University, Whiting School of Engineering, Baltimore, MD (USA)
pcDNA3.1+TrkA+Linker+YFP	Ampicillin	Kalina Hristova, Johns Hopkins University, Whiting School of Engineering, Baltimore, MD (USA)

Vektor	Resistenz	Referenz
pET_His6_StrepII_Cldn7	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_E160A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_F148A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_F148A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_R81A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_R81A_Y149A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_V70A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_V70A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_V70A_F148A_Y149A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_V70A_R81A_F148A_Y149A_E160A_F161A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_Y149A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_Cldn7_YF161A	Ampicillin	diese Arbeit
pET_His6_StrepII_LIC cloning vector	Ampicillin	Scott Gradia (Addgene plasmid # 29666 [118])
pET303/CT-His	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pET303CTHis_CurTA (TM)	Ampicillin	diese Arbeit
pET303CTHis_CurTB (N-Term)	Ampicillin	diese Arbeit
pET303CTHis_CurTC (C-term)	Ampicillin	diese Arbeit
pET303CTHis_slr0483s	Ampicillin	AG Schneider
pET303CTHis_TSPAN8	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_A164F	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_A164L	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_E160A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_F148A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_F161A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_F161A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_F161C	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G123L	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G123R	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G130D	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G130L	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G162D	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G162L	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G168L	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G168R	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G5L	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_G5R	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_R81A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_R81A	Ampicillin	diese Arbeit

Vektor	Resistenz	Referenz
pLexA_Cldn7_R81A_Y149A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_T99A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_T99P	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_V70A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_V70A_F148A_Y149A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_V70A_R81A_F148A_Y149A_E160A_F161A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_V85A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_V85D	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_Cldn7_Y149A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_GpA_G83I	Ampicillin	AG Schneider
pLexA_GpA_wt	Ampicillin	AG Schneider
pLexA_TSPAN8	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_TSPAN8_C232A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_TSPAN8_C74A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_TSPAN8_C75A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_TSPAN8_C7A	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA_TSPAN8_C83A	Ampicillin	diese Arbeit
pMalp2	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RC200530	Kanamycin	Origene, Rockville, MD, USA [119]
RC20269	Kanamycin	Origene, Rockville, MD, USA [120]

## 2.13 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 12) wurden entweder bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) oder bei Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt) synthetisiert. Die Lyophilisate wurden in sterilem, Nuklease freiem Wasser gelöst (100  $\mu$ M) und für die weitere Verwendung ein Aliquot mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M hergestellt. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 12:** Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
CLDN7 EcoRI rev	GCGCGCAATTCCACATACTCCTTGGAAG
CLDN7 HindIII fw	GCGCGCAAGCTTATGGCCAATTCGGGCCTG
CLDN7 NdeI for	GCGCGCCATATGGCCAATTCGGGCCTGCAG
CLDN7 NheI for	GCGCGCGCTAGCATGGCCAATTCGGGCCTG
CLDN7 QC G5L fw	CATATGGCCAATTCGCTGCTGCAGTTGCTGGGC
CLDN7 QC G5L re	GCCCAGCAACTGCAGCAGCGAATTGGCCATATG
CLDN7 QC G5R fw	CATATGGCCAATTCGCGCCTGCAGTTGCTGGGC
CLDN7 QC G5R re	GCCCAGCAACTGCAGGCGGAATTGGCCATATG
CLDN7 QC V85D fw	CACTCGAGCCCTAATGGATGTCTCCCTGGTGCTG

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
CLDN7 QC V85D re	CAGCACCAGGGAGACATCCATTAGGGCTCGAGTG
CLDN7 Sspl fw	GCGCGCAATATTATGGCCAATTCGGGCCTGC
CLDN7 TAA BamHI rev	GCGCGCGGATCCTTACACATACTCCTTGGAAAG
CLDN7 TAA Mlul rev	GCGCGCACGCGTTTACACATACTCCTTGGAAAG
Cldn7-mCherry-BamHI_re	GCGCGCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCC
Cldn7-mCherry-Linker-XhoI_re	GCGCGCCTCGAGACCACCAGAACCACCCTTGTACAGCTCGTC
CLDN7QC R81A fw	GCCTTGCAGGCCACTGCGGCCCTAATGGTGGTC
CLDN7QC R81A re	GACCACCATTAGGGCCGAGTGGCCTGCAAGGC
CLDN7QC T99A fw	GCCATGTTTGTGGCCGCGATGGGCATGAAGTGC
CLDN7QC T99A re	GCACTTCATGCCCATCGCGGCCACAAACATGGC
CLDN7QC T99P fw	GCCATGTTTGTGGCCCGATGGGCATGAAGTGC
CLDN7QC T99P re	GCACTTCATGCCCATCGGGGCCACAAACATGGC
CLDN7QC V85A fw	CACTCGAGCCCTAATGGCGGTCTCCCTGGTGCTG
CLDN7QC V85A re	CAGCACCAGGGAGACCGCCATTAGGGCTCGAGTG
CLDN7QCA164F fw	GTATGAGTTTGGCCCTTTTATCTTTATTGGCTGG
CLDN7QCA164F re	CCAGCCAATAAAGATAAAAGGGCCAAACTCATAC
CLDN7QCA164L fw	GTATGAGTTTGGCCCTCTGATCTTTATTGGCTGG
CLDN7QCA164L re	CCAGCCAATAAAGATCAGAGGGCCAAACTCATAC
CLDN7QCF161A fw	CCAACATTAAGTATGAGGCGGGCCCTGCCATCTTTATTGG
CLDN7QCF161C fw	CCAACATTAAGTATGAGTGCGGCCCTGCCATCTTTATTGG
CLDN7QCF161C re	CCAATAAAGATGGCAGGGCCGCACTCATACTTAATGTTGG
CLDN7QCF161C re	CCAATAAAGATGGCAGGGCCCGCCTCATACTTAATGTTGG
CLDN7QCG123L fw	CGTATAGCCATGGGTGGACTGATAATTTTCATCGTG
CLDN7QCG123L re	CACGATGAAAATTATCAGTCCACCCATGGCTATACG
CLDN7QCG123R fw	CGTATAGCCATGGGTGGACGTATAATTTTCATCGTG
CLDN7QCG123R re	CACGATGAAAATTATACGTCCACCCATGGCTATACG
CLDN7QCG130D fw	GGCATAATTTTCATCGTGGCAGATCTTGCCACCTTGGTAGC
CLDN7QCG130D re	GCTACCAAGGTGGCAAGATCTGCCACGATGAAAATTATGCC
CLDN7QCG130L fw	GGCATAATTTTCATCGTGGCACTGCTTGCCACCTTGGTAGC
CLDN7QCG130L re	GCTACCAAGGTGGCAAGCAGTGGCACGATGAAAATTATGCC
CLDN7QCG162D fw	CATTAAGTATGAGTTTGTATCCTGCCATCTTTATTGGC
CLDN7QCG162D re	GCCAATAAAGATGGCAGGATCAAACCTCATACTTAATG
CLDN7QCG162L fw	CATTAAGTATGAGTTTCTGCCTGCCATCTTTATTGGC
CLDN7QCG162L re	GCCAATAAAGATGGCAGGCAGAACTCATACTTAATG
CLDN7QCG168L fw	CCTGCCATCTTTATTCTGTGGGCAGGGTCTGCC
CLDN7QCG168L re	GGCAGACCCTGCCACAGAATAAAGATGGCAGG
CLDN7QCG168R fw	CCTGCCATCTTTATTCTGTGGGCAGGGTCTGCC
CLDN7QCG168R re	GGCAGACCCTGCCAACGAATAAAGATGGCAGG
CLDN7QCpc3G5L fw	CTTATGGCCAATTCGCTGCTGCAGTTGCTGGGC
CLDN7QCpc3G5L re	GCCCAGCAACTGCAGCAGCGAATTGGCCATAAG
CLDN7QCpc3G5R fw	CTTATGGCCAATTCGCGCCTGCAGTTGCTGGGC
CLDN7QCpc3G5R re	GCCCAGCAACTGCAGGCGCGAATTGGCCATAAG
CLDN7QCpLAG5L fw	GCATGGCCAATTCGCTGCTGCAGTTGCTGGGC

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
CLDN7QcPcLAG5L re	GCCCAGCAACTGCAGCAGCGAATTGGCCATGC
CLDN7QcPcLAG5R fw	GCATGGCCAATTCGCGCCTGCAGTTGCTGGGC
CLDN7QcPcLAG5R re	GCCCAGCAACTGCAGGCGGAATTGGCCATGC
Cldn7-SspI-Linker_fw	GCGCGCAATATTGGTGGTTCTGGTGGTATGGCCAATTCGGGC
CurT_A_Nsil_rev	GCGCGCATGCATTTTCAGCTTTCCAAAGG
CurT_B_ATG_XbaI_fw	GCGCGCTCTAGAATGGAAGAACAAAAGACAGC
CurT_C_Nsil_krev	GCATGCATGCATACCGCCAAAATTTGCTCC
CurTA-ATGXbaI_fw	GCGCGCTCTAGAATGCAACCCCTCATTTCCC
GA_QC_CurTC_re	GGATTATGCCAGGGAAATGAGGGGTTGCATTCTAGACCTCCTC TTAAAG
GA_QC_CurTC_fw	CTCTAGTAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGGTCTAGAATGC AACCCC
QC CLDN7 bG582C fw	GGGAATGAGAGCAAGGCTGGCTACCGTGCACCCCG
QC CLDN7 bG582C re	CGGGGTGCACGGTAGCCAGCCTTGCTCTCATTCCC
QC_CLDN7_E160A_fw	CTACCAACATTAAGTATGCGTTTGGCCCTGCCATC
QC_CLDN7_E160A_re	GATGGCAGGGCCAAACGCATACTTAATGTTGGTAG
QC_CLDN7_E160A-F161A_fw	CTACCAACATTAAGTATGCGGCGGGCCCTGCCATCTTTATTGG
QC_CLDN7_E160A-F161A_re	CCAATAAAGATGGCAGGGCCCGCCGATACTTAATGTTGGTAG
QC_CLDN7_F161A_fw	CAACATTAAGTATGAGGCGGGCCCTGCCATCTTTATTGG
QC_CLDN7_F161A_re	CCAATAAAGATGGCAGGGCCCGCCTCATACTTAATGTTG
QC_CLDN7_R81A_fw	GCCTTGCAAGCCACTGCGGCCCTAATGGTGGTC
QC_CLDN7_R81A_re	GACCACCATTAGGGCCGAGTGGCCTGCAAGGC
QC_Cldn7_bC241G_fw	CGGCCTTGCAAGCCACTGGAGCCCTAATGGTGG
QC_Cldn7_bC241G_re	CCACCATTAGGGCTCCAGTGGCCTGCAAGGCCG
QC_CLDN7_F148A_fw	CCATCAGATTGTCACAGACGCGTATAACCCTTTGATCCC
QC_CLDN7_F148A_re	GGGATCAAAGGGTTATACGCGTCTGTGACAATCTGATGG
QC_CLDN7_F148A-Y149A_fw	CCATCAGATTGTCACAGACGCGGCGAACCCCTTTGATCCCTACC
QC_CLDN7_F148A-Y149A_re	GGTAGGGATCAAAGGGTTCGCCGCGTCTGTGACAATCTGATGG
QC_CLDN7_V70A_fw	CAAAATGTACGACTCGGCGCTCGCCCTGTCCGCG
QC_CLDN7_V70A_re	CGCGGACAGGGCGAGCGCCGAGTCGTACATTTTG
QC_CLDN7_Y149A_fw	GCCATCAGATTGTCACAGACTTTGCGAACCCCTTTGATCCCTACC
QC_CLDN7_Y149A_re	GGTAGGGATCAAAGGGTTCGCAAAGTCTGTGACAATCTGATGGC
QCTSpanMCherryFW	GTGGAGGAAGTACCGGTAGCAAGGGCGAGGAGG
QCTSpanMCherryRV	CCTCCTCGCCCTTGCTACCGGTAATTCCTCCAC
TSPAN8 EcoRI rev	GCGCGCGAATTCTTTGTTCCCGATCTGGC
TSPAN8 HindIII for	GCGCGCAAGCTTATGGCAGGTGTGAGTGCC
TSPAN8 NheI for	GCGCGCGCTAGCATGGCAGGTGTGAGTGCC
Tspan8 Nsil rev	GCGCGCATGCATTTTGTTCCTCGATCTGGC
TSPAN8 TAA BamHI rev	GCGCGCGGATCCTTATTTGTTCCCGATCTGGC
Tspan8 XbaI fw	GCGCGCTCTAGAATGGCAGGTGTGAGTGCC
TSPAN8_C232_fw	GTTTTCTATGGTCTGTATGCGCAGATCGGGAACAAAG
TSPAN8_C232_re	CTTTGTTCCCGATCTGCGCATAACAGGACCATAGAAAAC
TSPAN8_C74A_fw	CTGGGCTTCTGGCAGCGTGGGCTGCTATAAAAAG

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
TSPAN8_C74A_re	CTTTTATAGCACCGCACGCTGCCAGGAAGCCCAG
TSPAN8_C75A_fw	GGCTTCCTGGCATGCGCGGGTGTCTATAAAAGAAAGTCGC
TSPAN8_C75A_re	GCGACTTTCTTTTATAGCACCCGCGCATGCCAGGAAGCC
TSPAN8_C7A_fw	GCAGGTGTGAGTGCCGCGATAAAATATTCTATG
TSPAN8_C7A_re	CATAGAATATTTTATCGCGGCACTCACACCTGC
TSPAN8_C83A_fw	GCTATAAAAGAAAGTCGCGCGATGCTTCTGTTGTTTTTC
TSPAN8_C83A_re	GAAAAACAACAGAAGCATCGCGCGACTTTCTTTTATAGC

## 2.14 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tabelle 13) wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad (München), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Darmstadt) bezogen.

**Tabelle 13:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bio-Beads™ SM-2	BioRad, München
Cantilever SNL A	Bruker, Billerica, MA, USA
Dialysemembran Spectra/Por® Biotech CE MWCO 20 000	Roth, Karlsruhe
Dialysemembran Spectr/Por® MWCO 12 000- 14 000	Roth, Karlsruhe
Disposable PD 10 Desalting Columns	GE Healthcare
Disposable Plastic Colums 5 mL	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Filterpapier – Thick Block Paper	BioRad, München
Halb-Mikro-Küvette, PS	Sarstedt, Nümbrecht
Kieselgelplatte, Silica Gel 60 F <sub>254</sub>	Merck, Darmstadt
Muskovid Mica V1 (12 mm Durchmesser, 0,21 mm Dicke)	Ted Pella, Redding, CA, USA
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
Quarzglas Suprasil-Küvetten	Hellma, Müllheim
Spectra/Por®-Universal-Verschlussklammern	Roth, Karlsruhe

## 2.15 Laborgeräte

Die verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14:** Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidgel-Scanner	ViewPix 700	Biostep, Burkhardtsdorf
AFM	Multimode 8 Nanoscope V controller	Bruker, Billerica, MA, USA

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bakterien-Brutschrank	B28	Binder, Tuttlingen
Brutschrank für Zellkultur	CB150	Binder, Tuttlingen
CD-Spektrometer	J-815 mit MPTC-490-515	Jasco, Oklahoma City, OK, USA
Chemilumineszenz-Detektionseinheit	Stella	Raytest, Straubenhardt
FLPC-System	ÄKTApurifier™ 10	GE Healthcare, München
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer.Z1	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Fluoreszenzspektrometer	Spectrofluorometer Fluoromax 4	Horiba Scientific, Kyoto, Japan
Geldokumentationsgerät	Quantum-ST4 1100/26MX	PEQLAB, Erlangen
Gelelektrophoresekammern	Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad, München
	Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, München
	PerfectBlue Gelsystem S, M, L	Peqlab, Erlangen
Heiz- & Rührplatte	MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	R-234	Sharp, Köln
PCR-Gerät	Thermocycler TGradient 96	Biometra, Göttingen
Photometer	Lambda 35 UV/VIS Spektrometer	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
	Lambda 465 PDA UV/VIS	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
	Ultrospec 10- Cell density meter	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Plattenlesegerät	PowerWaveXS	BioTek, Bad Friedrichshall
	FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
Rotoren	JA 25.50	Beckmann Coulter, Krefeld
	JLA-8.100	Beckmann Coulter, Krefeld
	70 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
	90 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
	SW40	Beckmann Coulter, Krefeld
Schüttelinkubator	Multitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Semi-dry Western Blot-Apparatur	Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad, München
Sterilbank (Zellkultur)	Hera guard	Heraeus, Hanau
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
UV-Tisch	Transilluminator 4000	Stratagene, Heidelberg
	MinUVis Duo-Strahler für Dünnschicht- und Säulenchromatographie	Desaga, Heidelberg
Vortex-Mixer	Reagenzglasschüttler	VWR, Ismaning

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zellaufschlussgerät	Microfluidizer LM20	Microfluidics International Corporation, MA, USA
Zentrifugen	Avanti® J-26 XP	Beckmann Coulter, Krefeld
	Optima™ L-100K Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
	Sprout™	Biozym, Hessisch Oldendorf
	5424	Eppendorf, Hamburg
	5415 R	Eppendorf, Hamburg
	5810 R	Eppendorf, Hamburg

## 2.16 Programme

Die verwendeten Programme sind in Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 15:** Verwendete Programme

Verwendung	Programm
AFM	GWYDDION
Bildbearbeitung	Adobe Illustrator 2020 Adobe Photoshop 2020 Microsoft PowerPoint 2019
Chemische Strukturen	Chemsketch
Gerätesoftware	FluorEssence™ 3.5.1.20, Horiba Scientific Gen5™ 1.04.5, BioTek MARS Data Analysis Software, BMG Labtech Quantum ST4, Vilber Lourmat Spectra Manager, Jasco Unicorn™ 5.10, GE Healthcare UV Win Lab 4.0.0, PerkinElmer UV Win Lab 5.1.5.0637, PerkinElmer ViewPixControl, Version 1.5.9, Biostep XStella 1.0, Raytest ZEN 2.3 (blue edition), Carl Zeiss Microscopy
Literatur-Verwaltung	Citavi 6
Proteinstrukturanalyse	USFC Chimera 1.14
Quantifizierung von SDS-PAGEs und Western Blots	<i>ImageJ</i>
Tabellen- & Diagrammverarbeitung	Microsoft Excel 2019 Origin 2020
Textverarbeitung	Microsoft Word 2019

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung eines, durch zwei Primer definierten, DNA-Bereiches.

Bei einer PCR wird mittels Hitze die Matrizen-DNA denaturiert. Anschließend lagern sich die Primer komplementär an die Matrizen-DNA an (Hybridisierung). Durch Anlagerung der Phusion®-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) wird die DNA in 5' → 3' Richtung synthetisiert (Elongation). Die Wiederholung der Schritte von Denaturierung bis Elongation dienen der Elongation des definiertes DNA-Bereichs. Die PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 3.1.3) überprüft.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das PCR-Programm sind Tabelle 16 und Tabelle 17 zu entnehmen.

**Tabelle 16:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit 50 µL Gesamtvolumen.

Volumen [µL]	Komponente
1	Matrix-DNA
1	Primer, <i>forward</i> (10 µM)
1	Primer, <i>reverse</i> (10 µM)
1	dNTP's (2 mM)
0,5	Phusion®-DNA-Polymerase
10	5x Phusion® Puffer
1	DMSO
1	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
33,5	Nukleasefreies H <sub>2</sub> O, steril

**Tabelle 17:** Verwendetes PCR-Programm.

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]
Start-Denaturierung	1	98
Denaturierung	0,5	98
Hybridisierung	1	55
Elongation	1	72
End-Elongation	7,5	72
Lagerung	unendlich	4

} 36 Zyklen

### 3.1.2 Ortsspezifische Mutagenese – QuickChange PCR

Die ortsspezifische Mutagenese ist eine Form der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und dient der Einführung von Einzel- oder Mehrfachmutationen in Plasmidvektoren. Hierzu werden Primer benötigt, die mit der Plasmid-DNA überlappen, jedoch an der gewünschten Stelle die veränderte Basenabfolge besitzen.

Mit der Matrix-DNA und den entsprechenden Primern wurde eine PCR durchgeführt (PCR-Programm Tabelle 19). Die Zeit der Elongation wurde dabei über die Größe der Plasmid-DNA bestimmt. Die Phusion®-DNA-Polymerase verknüpft im Schnitt 1 000 Basenpaare pro Minute. Die Dimethylsulfoxid (DMSO)- und Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)-Konzentration wurde verändert, um eine maximale Ausbeute zu erhalten (PCR-Ansatz Tabelle 18). Zur Analyse der PCR wurden 5 µL des PCR-Ansatzes auf ein 1 %iges Agarosegel (siehe Kap. 3.1.3) aufgetragen. Zum restlichen PCR-Ansatz wurde 1 µL DpnI gegeben, um die Matrix-DNA zu degradieren. Hierfür wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. 5 µL des DpnI-verdauten Ansatzes wurde in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert (siehe Kap. 3.2.2).

**Tabelle 18:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur ortsspezifischen Mutagenese mit 50 µL Gesamtvolumen. Der Zusatz von MgCl<sub>2</sub> und DMSO kann je nach Bedarf angepasst werden.

Volumen [µL]			Komponente
1			Matrix-DNA
1			Primer, <i>forward</i> (10 µM)
1			Primer, <i>reverse</i> (10 µM)
1			dNTP's (2 mM)
0,5			Phusion®-DNA-Polymerase
10			5x Phusion® Puffer
0	1	1,5	DMSO
0	1	1,5	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
35,5	33,5	32,5	H <sub>2</sub> O, steril

**Tabelle 19:** Verwendetes PCR-Programm zur ortsspezifischen Mutagenese.

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]	
Start-Denaturierung	1	98	} 16 Zyklen
Denaturierung	0,5	98	
Hybridisierung	1	55	
Elongation	1 000 Anzahl der Basenpaare	72	
End-Elongation	7,5	72	
Lagerung	unendlich	4	

### 3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA. Durch die negative Ladung des Ribose-Phosphat-Rückgrads der DNA wandert diese im elektrischen Feld in Richtung Anode. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller durch das Agarose-Polymergitter als Große, hierdurch kann der Größe nach aufgetrennt werden.

1 % (w/v) Agarose wurde mit TAE-Puffer (Tabelle 1) versetzt und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten mit Probenkamm gegossen und bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Der Gelschlitten wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. DNA-Proben wurden 5:1 mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 - 150 V.

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen wurde das Agarosegel für 15 - 30 Minuten in ein Ethidiumbromid-haltiges Färbebad gelegt. Durch Anregung mit UV-Licht konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

### 3.1.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (siehe Kap. 3.1.3) wurde das Agarosegel mittels Ethidiumbromid angefärbt. Das Agarosegel wurde auf einem UV-Tisch betrachtet und die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und nach Herstellerangaben (*Gel/PCR DNA Fragments Kit*, Geneaid, New Taipei City, Taiwan, bzw. *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, Macherey-Nagel, Düren) extrahiert.

### 3.1.5 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Plasmidpräparationen dienen der Isolierung von DNA aus *E. coli*-Bakterien. Sie ermöglichen die Herstellung größerer Mengen an DNA.

#### 3.1.5.1 Plasmidminipräparation mittels Kit

Durch das Arbeiten mit Kitsystemen kann hochreine Plasmid-DNA erhalten werden, welche für Transfektionen, Transformationen, Sequenzierungen und Klonierungen benötigt wird.

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *High-Speed Plasmid Mini Kit* (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) oder dem *NucleoSpin Plasmid, Mini kit for Plasmid DNA* (Macherey-

Nagel, Düren) (siehe Tabelle 7). Die DNA wurde stets mit 50  $\mu\text{L}$ , 70 °C heißem, Nuclease freiem Wasser eluiert.

### 3.1.5.2 Plasmidminipräparationen mittels alkalischer Lyse

Für Kontrollrestriktionen, zur Überprüfung von Klonierungen, kann eine DNA-Isolierung durch alkalische Lyse erfolgen, da hier kein hoher Reinheitsgrad benötigt wird.

Zunächst wurden 4 mL einer ÜN-Kultur in einem 2 mL Reaktionsgefäß geerntet (zweimal 2 mL, je 1 min, 20 000  $g$ , RT). Um die Zellen zu lysieren wurde das *E. coli*-Pellet in 300  $\mu\text{L}$  eiskaltem P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 300  $\mu\text{L}$  P2-Puffer werden die Proteine im Lysat denaturiert. Nach Zugabe von P2-Puffer wird die Lösung invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 300  $\mu\text{L}$  eiskaltem P3-Puffer wurden die Proteine gefällt. Zur Abtrennung der Proteine, Zelltrümmern und chromosomaler DNA wurde für 15 min, bei 20 000  $g$ , bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 720  $\mu\text{L}$  Isopropanol wurde die DNA gefällt. Um die komplette DNA zu fällen, wurde das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (20 min, 20 000  $g$ , 4 °C) pelletiert. Zum Waschen des DNA-Pellets wurde dieses zweimal in 500  $\mu\text{L}$  75 %igem Ethanol aufgenommen und anschließend wieder pelletiert (5 min, 20 000  $g$ , 4 °C). Das Ethanol wurde vollständig abgenommen und das Pellet wurde unter einem stetigen Luftstrom getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 50  $\mu\text{L}$  Nuklease freiem Wasser aufgenommen. Für eine Kontrollrestriktion wurden 3  $\mu\text{L}$  der DNA-Lösung verwendet.

### 3.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierbei entspricht eine  $A_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\text{pg}/\mu\text{L}$  doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde über den Quotienten von  $A_{230}/A_{280}$  bestimmt. Weichen die Werte von  $A_{230}/A_{280} = 1,8$  ab, ist eine Verunreinigung durch RNA bzw. Proteine vorhanden.

### 3.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an spezifischen Stellen, hierzu hydrolysieren sie die Phosphodiesterbindung des Ribose-Phosphat-Rückgrads. Es können zwei Arten von Schnittstellen

entstehen. Zum einen *sticky ends*, wobei Doppelstränge mit überlappenden Einzelsträngen entstehen und zum anderen *blunt ends*, was einer glatten Schnittstelle am Doppelstrang entspricht.

Der Restriktionsverdau wurde eingesetzt, um zu Klonierungszwecken spezifische DNA-Enden zu erzeugen sowie für die Überprüfung dieser Klonierungen.

Für präparative Versuche wurde in einem Gesamtvolumen von 50-60 µL gearbeitet. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und Puffer wurden nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) eingesetzt. Die Restriktion erfolgte für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Restriktions-Ansatz 5:1 mit 6x Auftragspuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Das gewünschte DNA-Fragment wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert (siehe Kap. 3.1.4).

Für eine analytische Kontrollrestriktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µL gearbeitet. Nach erfolgter Restriktion wurde das Ergebnis mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 3.1.3) analysiert.

### **3.1.8 Ligation**

Eine Ligation ermöglicht es restringierte Fremd-DNA in einen restringierten, linearisierten Plasmidvektor einzubringen. DNA-Stränge mit komplementären Enden wurden mit der T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) ligiert. Das Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxy- und einem 5'-Phosphat-Rest des DNA-Rückgrats.

Es wurden 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Das Insert wurde in einem vierfachen molaren Überschuss zugegeben. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 20 µL durchgeführt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz für eine Transformation (siehe Kap. 3.2.2) in *E. coli*-Bakterien verwendet.

### **3.1.9 Sequenzierung**

Zur Kontrolle der hergestellten Plasmide, nach Klonierungen oder ortsspezifischer Mutagenese, wurde die DNA sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg).

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Damit *E. coli*-Bakterien Fremd-DNA besser aufnehmen, wurden diese nach der Methode von Chung und Miller [121] chemisch kompetent gemacht. Zu Beginn wurde eine Vorkultur (5 mL) mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm inokuliert. Diese Kultur wurden dann für etwa 17 h (über Nacht, ÜN), bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienschüttler kultiviert. Am nächsten Morgen wurde eine 50 mL Hauptkultur mit der ÜN-Kultur, im Verhältnis 40:1 inokuliert. Die Hauptkultur wurde bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) von  $\geq 0,5$ , bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienschüttler kultiviert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 3 220 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 5 mL eiskaltem TSB (*Tryptic Soy Broth*)-Medium aufgenommen und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Aliquots von 100  $\mu$ L wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

Während einer Transformation nehmen kompetente Bakterien Plasmid-DNA aus dem extrazellulären Umfeld auf. Birgt die Plasmid-DNA einen Selektionsvorteil (z.B. Antibiotikaresistenz) so wird diese im Bakterium vervielfältigt. In dieser Arbeit wurden chemisch kompetente Zellen verwendet (siehe Kap. 3.2.1), welche mittels Hitzeschock transformiert wurden.

Die zu transformierenden *E. coli*-Bakterien (100  $\mu$ L-Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1  $\mu$ L des gewünschten DNA-Plasmids steril zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die *E. coli*-Membran wurde nun mittels Hitzeschock (43 °C, 90 s), für die Plasmid-DNA, permeabel gemacht. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 500  $\mu$ L steriles LB-Medium zu den *E. coli* gegeben. Anschließend erfolgte eine Kultivierung ohne Selektionsdruck für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienschüttler. Es wurden 200  $\mu$ L der Bakterien-Suspension auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Agar-Platte wurde anschließend bei 37 °C für ca. 17 h (über Nacht) in den Brutschrank gestellt.

Anschließend konnten Einzelkolonien von der Platte in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt werden.

### 3.2.3 Testexpression

Da nicht jedes Protein in jedem *E. coli*-Stamm exprimiert wird, wurde eine Testexpression in kleinem Maßstab durchgeführt, um den geeigneten Bakterienstamm zu identifizieren. Zunächst wurde das entsprechende Expressionsplasmid in die Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), Tuner(DE3)pLysS, C43(DE3) und Clear Coli® BL21(DE3) transformiert (siehe Kap. 3.2.2). Am folgenden Tag wurde eine 4 mL Vorkultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Kolonie inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht (ca. 17 h) bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die 20 mL Hauptkultur (LB-Medium, entsprechendes Antibiotikum, je zwei Kulturen pro Bakterienstamm) wurde anschließend mit der Vorkultur auf eine spezifische OD<sub>600</sub> (Tabelle 20) inokuliert. Die OD<sub>600</sub> richtet sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen *E. coli*-Stämme.

**Tabelle 20:** OD<sub>600</sub> für die Inokulation der Hauptkultur.

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>OD<sub>600</sub> für Inokulation der Hauptkultur</b>
HMS174(DE3)pLysS	0,1
BL21(DE3)	0,1
BL21-gold(DE3)	0,1
BL21(DE3)pLysE	0,15
BL21(DE3)pLysS	0,1
Origami2(DE2)	0,1
Origami2(DE2)pLysS	0,2
Rosetta2(DE3)	0,1
Rosetta2(DE3)pLysS	0,2
Rosetta-gami2(DE3)	0,2
Rosetta-gami2(DE3)pLysS	0,2
Tuner(DE3)	0,1
Tuner(DE3)pLysS	0,15
C43(DE3)	0,1
Clear Coli® BL21(DE3)	0,2

Erreichte die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 wurde die Proteinexpression mittels Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, final 0,5 mM) induziert. An dieser Stelle wurde eine Probe für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE genommen, sodass in 100 µL Gelprobe eine OD<sub>600</sub> = 0,5 vorlag. Nun wurde eine Kultur für drei Stunden, bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator weiter kultiviert, während die andere Kultur bei 20 °C/25 °C über Nacht bei 200 rpm kultiviert wurde. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden erneut Proben für die SDS-PAGE-Analyse genommen (analog zu den Proben

vor der Induktion). Zuletzt erfolgte die SDS-PAGE-(siehe Kap. 3.3.6) und die Western Blot-Analyse (siehe Kap. 3.3.7) der Testexpression um den am besten geeigneten *E. coli*-Stamm zu identifizieren.

### 3.2.4 Kultivierung von *E. coli*-Bakterien, Heterologe Expression

Für die heterologe Überexpression von Proteinen in *E. coli* wurde das entsprechende Expressionsplasmid in den entsprechenden Expressionsstamm transformiert (siehe Kap. 3.2.2, Tabelle 21). Anschließend wurde eine 50 mL Vorkultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie inokuliert. Diese wurde über Nacht (ca. 17 h), bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienrüttler kultiviert. Die Vorkultur wurde in die 2 L Hauptkultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) überführt. Die Hauptkultur wurde bis zu einer  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$  bei 37 °C und 150 rpm im Bakterienrüttler kultiviert. Dann erfolgte die Induktion mittels Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG, final 0,5 mM). Die weitere Kultivierung erfolgte entweder für drei Stunden bei 37 °C und 150 rpm oder über Nacht bei 20 °C/25 °C und 150 rpm im Bakterienrüttler. Die Bedingungen für die entsprechenden Konstrukte sind Tabelle 21 zu entnehmen. Nach erfolgter Expression wurden die *E. coli* Bakterien geerntet (10 min, 1 700 g, 4 °C). Das *E. coli*-Pellet aus 2 L Expressionskultur wurde in 25 mL P-Puffer (Tabelle 1) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 21:** Expressionsvektor, *E. coli* Expressionsstamm und Expressionsbedingungen der verschiedenen Proteine (ÜN  $\triangleq$  über Nacht).

Expressionsvektor	<i>E. coli</i> -Stamm	Expressionsbedingungen
pET303CTHis_slr0483s	Rosetta-gami2(DE3)	3 h, 37 °C
pET303CTHis_slr0483A (TM)	Rosetta-gami2(DE3)	ÜN, 20 °C
pET303CTHis_slr0483B (N-term)	Clear Coli® BL21(DE3)	3 h, 37 °C
pET303CTHis_slr0483C (C-term)	Tuner(DE3)pLysS	3 h, 37 °C
pET303CTHis_TSPAN8	Tuner(DE3)pLysS	ÜN, 25 °C
pET_His6_StrepII_Cldn7	Tuner(DE3)pLysS	ÜN, 20 °C

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung von CurT

Im Folgenden wird die Isolierung von CurT aus einem Bakterienpellet, einer 2 L Expressionskultur des Plasmids pET303CTHis\_slr0483s in Rosetta-gami2(DE3) beschrieben.

##### 3.3.1.1 Zellaufschluss und Gewinnung der Membranfraktion

Ein Bakterienpellet einer heterologen Expression von CurT (siehe Kap. 3.2.4) in 25 mL P-Puffer wurde für den Zellaufschluss verwendet. Das Volumen der Bakterien-Suspension wurde mit P-Puffer auf 50 mL eingestellt. Es wurden 50 µL Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) zugegeben, um Proteolyse zu verhindern. Das Auftauen erfolgte anschließend bei Raumtemperatur. Die aufgetaute Suspension wurde mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem, auf Eis homogenisiert. Das eisgekühlte Homogenisat wurde anschließend in drei Durchgängen über das Microfluidizer-Zellaufschlusssystem bei 18 000 PSI aufgeschlossen. Durch eine zehnmündige Zentrifugation bei 12 000 *g* und 4 °C wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörperchen abgetrennt. Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation (1 h, 117 000 *g*, 4 °C) unterzogen um die Membranfraktion (Pellet) zu erhalten. Der Überstand, mit den löslichen Proteinen wurde verworfen und mit dem Pellet weitergearbeitet.

##### 3.3.1.2 Solubilisation der Membran mit LDAO

Zur Isolierung von CurT muss dieses aus der *E. coli*-Membran herausgelöst werden, hierzu wurde die Membranfraktion mit dem Detergenz Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) solubilisiert.

Das Membranpellet aus Kapitel 3.3.1.1 wurde in 50 mL P-Puffer mit 2 % (w/v) LDAO resuspendiert und mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur für eine Stunde invertiert.

##### 3.3.1.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) beruht auf dem Chelateffekt [122]. Dabei wird ausgenutzt, dass ein Polyhistidinschwanz (*His-tag*) am Protein ein immobilisiertes Ni<sup>2+</sup>-Ion komplexiert und somit an das Säulenmaterial binden kann. Ni<sup>2+</sup> wird über Nitrilotriessigsäure (NTA) und einen Spacer an Agarosebeads gebunden und somit immobilisiert. Durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration kann der *His-tag* verdrängt werden und das Protein wieder von der Säule eluiert werden. Werden geringere

Imidazol-Konzentrationen eingesetzt, können unspezifisch gebundene Proteine vom Säulenmaterial abgewaschen werden.

Damit CurT über IMAC gereinigt werden kann, wurde ein C-terminaler His-*tag* im Expressionsplasmid fusioniert.

Zum Äquilibrieren der Ni-NTA-Agarose wurden 5 mL Ni-NTA-Agarose Suspension (20 %ig in EtOH (v/v)) mit 10 mL P-Puffer, 1 % (w/v) LDAO und 5 mM Imidazol gewaschen. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose, sowie final 5 mM Imidazol zur solubilisierten Membranfraktion aus Kapitel 3.3.1.2 gegeben. Die Suspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur invertiert. Im Anschluss wurde die Suspension auf eine Säule (10 mL) gegeben. Zunächst wurde mit 30 mL P-Puffer, 0,2 % (w/v) LDAO und 5 mM Imidazol gewaschen. Im zweiten Waschschriff wurde mit 50 mL P-Puffer, 0,2 % (w/v) LDAO und 25 mM Imidazol gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine vom Säulenmaterial zu lösen. Die Elution erfolgte mit final 10 mL Elutionspuffer (P-Puffer, 0,2 % (w/v) LDAO und 500 mM Imidazol). Dabei wurde die Säule immer für fünf Minuten mit 2 mL Elutionspuffer inkubiert. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt und das Volumen mittels Amicon® Ultra Zentrifugen Filter (Sigma, MWCO 10 000 Da) auf 2,5 mL eingengt und anschließend wurde das Imidazol über eine Entsalzungssäule (siehe Kap. 3.3.4) entfernt. Das erhaltene Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### **3.3.2 Isolierung von Tetraspanin-8**

Die Isolierung von Tetraspanin-8 aus einem Bakterienpellet, einer 2 L Expressionskultur des Plasmids pET303CTHis\_TSPAN8 in Tuner(DE3)pLysS wird im Folgenden aufgezeigt.

#### **3.3.2.1 Zellaufschluss und Gewinnung der Membranfraktion**

Ein Zellpellet in 25 mL Puffer A einer heterologen Expression von Tetraspanin-8 (siehe Kap. 3.2.4) wurde für den Zellaufschluss verwendet. Die Bakterien-Suspension wurde auf 50 mL mit Puffer A aufgefüllt, mit 50 µL Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) versetzt und bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall am Branson Sonifier 250. Dabei wurden vier Zyklen einer je dreiminütigen Ultraschallbehandlung (Duty Cycle 50 %, Output Control 5) und je einminütiger Pause auf Eis durchgeführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation (10 min, 12 000 g, 4 °C) um Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörperchen abzutrennen. Der Überstand (Lysat) wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte eine Ultrazentrifugation für eine Stunde, bei

117 000 g und 4 °C, um die Membranfraktion zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und anschließend wurde mit dem Membranpellet weitergearbeitet.

### **3.3.2.2 Solubilisation der Membran mit DDM**

Für die genaue Charakterisierung von Membranproteinen ist es erforderlich diese in ausreichender Menge und hohem Reinheitsgrad vorliegen zu haben. Die Membranfraktion von *E. coli* enthält jedoch neben dem heterolog exprimierten Tetraspanin-8 noch andere Membranproteine und vor allem die Lipide der Membran. Um Tetraspanin-8 frei von diesen anderen Bestandteilen zu erhalten, wurde die Membranfraktion mit n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) solubilisiert. DDM bildet Mizellen aus in denen sowohl Lipid als auch Proteine gelöst werden.

Das Membranpellet (siehe Kap. 3.3.2.1) wurde in 50 mL Puffer B mit 1 % (w/v) DDM aufgenommen und mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung für eine Stunde bei 4 °C invertiert. Um nicht solubilisierte Membranen und Proteine abzutrennen erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 3 220 g. Im Überstand befand sich nun das in DDM solubilisierte Protein.

### **3.3.2.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Das Prinzip der IMAC ist in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Um die IMAC für Tetraspanin-8 nutzen zu können, wurde bei der Klonierung ein C-terminaler His-*tag* mit dem Protein fusioniert.

Zunächst wurde 1 mL Ni-NTA-Agarose Suspension (20 % in EtOH (v/v)) mit 10 mL Puffer B, 0,04 % DDM und 5 mM Imidazol äquilibriert. Die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose wurde anschließend zu dem solubilierten Protein (aus Kap. 3.3.2.2) gegeben. Zusätzlich wurden final 5 mM Imidazol zugegeben, um eine unspezifische Bindung an die Ni-NTA-Agarose zu verhindern. Diese Suspension wurde bei 4 °C über Nacht invertiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine Säule (5 mL) gegeben. Gewaschen wurde das Säulenmaterial mit Puffer B, 0,04 % DDM und steigenden Imidazol-Konzentrationen (10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM). Zunächst wurde mit 25 mL Puffer mit 5 mM Imidazol gewaschen. Anschließend folgten 20 mL 10 mM Imidazol-Puffer, 20 mL 20 mM Imidazol-Puffer, 20 mL 50 mM Imidazol-Puffer und 20 mL 100 mM Imidazol-Puffer. Die Elution erfolgte dann mit einer Imidazol-Konzentration von 250 mM im Puffer. Es wurde mit einem Volumen von 1 mL eluiert. Dazu wurde der Elutionspuffer für fünf Minuten mit dem Säulenmaterial inkubiert. Der Elutionsschritt wurde fünfmal wiederholt. Das isolierte Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### 3.3.3 Isolierung von Claudin-7

Im Folgenden wird die Isolierung von Claudin-7 aus einem Bakterienpellet beschrieben. Das Bakterienpellet entspricht einer 2 L Expressionskultur des Plasmids pET\_His6\_StrepII\_Cldn7 in Tuner(DE3)pLysS.

#### 3.3.3.1 Zellaufschluss und Gewinnung der Membranfraktion

Für den Zellaufschluss wurde ein Bakterienpellet einer heterologen Expression von Claudin-7 (siehe Kap. 3.2.4) verwendet. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Dabei wurde das Volumen mit P-Puffer (Tabelle 1) auf 50 mL aufgefüllt und 50 µL Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) zugegeben. Zur Homogenisation der Bakteriensuspension wurde diese, mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem, auf Eis homogenisiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterien über das Microfluidizer-Zellaufschlusssystem. Es wurden drei Durchgänge mit je 18 000 PSI durchgeführt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörperchen wurden durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 12 000 g und 4 °C abgetrennt. Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der Überstand (Lysat) einer Ultrazentrifugation unterzogen. Diese erfolgte für eine Stunde, bei 117 000 g und 4 °C. Die löslichen Zellbestandteile (Überstand) wurden verworfen. Das Membranpellet wurde für die weitere Isolierung von Claudin-7 verwendet.

#### 3.3.3.2 Solubilisation der Membran mit LDAO

Um die anderen Bestandteile der *E. coli*-Membran von Claudin-7 trennen zu können, wurde diese mit Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) solubilisiert. In den LDAO Mizellen werden alle Membranproteine, sowie die Membranlipide aufgenommen. Anschließend kann Claudin-7 aus diesem Solubilisat über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) gereinigt werden.

Das gewonnene Membranpellet aus Kapitel 3.3.3.1 wurde in 50 mL P-Puffer mit 2 % (w/v) LDAO aufgenommen. Die Homogenisation erfolgte mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem. Die Lösung wurde in einem Über-Kopf-Schüttler für eine Stunde bei Raumtemperatur invertiert.

#### 3.3.3.3 Immobilisierte Affinitätschromatographie

Je nach Verwendungszweck des gereinigten Claudin-7 erfolgte die immobilisierte Affinitätschromatographie in 0,2 % (w/v) LDAO (Rekonstitution in DOPC (vgl. Kapitel 3.3.16)) oder in

5 mM n-Dodecyl- $\beta$ -maltosid (DDM) (GPC (vgl. Kapitel 3.3.11), SDS-Titration (vgl. Kapitel 3.3.12), CD-Messungen (vgl. Kapitel 3.5.3), Test auf elektrostatische Wechselwirkungen (vgl. Kapitel 3.3.13)).

#### **3.3.3.3.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Das der IMAC zugrunde liegende Prinzip ist in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. IMAC kann für Claudin-7 genutzt werden, da ein His-*tag* N-terminal im Expressionsvektor fusioniert wurde.

Zunächst wurden 5 mL Ni-NTA-Agarose Suspension (20 %ig in EtOH (v/v)) mit 10 mL P-Puffer, 5 mM DDM/0,2 % (w/v) LDAO und 5 mM Imidazol äquilibriert. Die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose wurde zu der solubilisierten Membranfraktion (siehe Kap. 3.3.3.2) gegeben. Zusätzlich wurde final 5 mM Imidazol zugegeben, um unspezifische Bindung an die Ni-NTA-Agarose zu verhindern. Diese Suspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur invertiert. Die Suspension wurde auf eine 10 mL Säule gegeben, woraufhin zwei Waschschritte folgten. In Schritt eins wurde mit 30 mL P-Puffer, 5 mM DDM/0,2 % (w/v) LDAO und 5 mM Imidazol gewaschen. Im zweiten Schritt wurde die Imidazolkonzentration auf 50 mM erhöht und mit einem Volumen von 50 mL gewaschen. Die Elution erfolgte in fünf 2 mL-Schritten mit einer Imidazolkonzentration von 500 mM. Dabei wurde das Säulenmaterial je 5 min mit dem Elutionspuffer inkubiert. Je nach Verwendung wurden die Eluate vereinigt und direkt weiterverwendet, oder das Volumen mittels Amicon® Ultra Zentrifugen Filters (Sigma, MWCO 10 000 Da) auf 2,5 mL eingengt. Das Imidazol wurde durch eine Entsalzungssäule (siehe Kap. 3.3.4) aus dem konzentrierten Eluat entfernt. Das erhaltene Protein wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.3.3.2 Strep-Tactin® Säule**

Die Reinigung über eine Strep-Tactin®-Säule beruht auf der Bindung von Biotin an Streptavidin. Dabei wird eine Peptidsequenz an das zu reinigende Protein fusioniert, welches in die Biotin-Bindetasche des Streptavidins bindet [123]. Die Peptidsequenz besteht aus den acht Aminosäuren Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys. Strep-Tactin® ist ein Streptavidin-Derivat und wird an das Säulenmaterial fusioniert. Durch Zugabe von Desthiobiotin wird der Strep-Tag II vom Strep-Tactin® verdrängt und das rekombinante Protein kann eluiert werden. Zur Regeneration der Strep-Tactin®-Säule wird diese mit 2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA) gewaschen, welches Desthiobiotin aus der Bindetasche verdrängt. HABA kann wiederum durch Waschen der Säule mit Puffer abgelöst werden und die Säule kann wiederverwendet werden [124].

Diese Methode kann für Claudin-7 verwendet werden, da N-terminal zusätzlich zum His-*tag* ein *Strep-Tag II* fusioniert wurde.

Zunächst wurden 3 mL Säulenmaterial mit 30 mL SW-Puffer (zehnfaches Säulenvolumen, Tabelle 1) äquilibriert um HABA vom Säulenmaterial zu lösen. Anschließend wurde Claudin-7 (nach Ni-NTA, in DDM) zum Säulenmaterial gegeben. Die Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur invertiert. Danach wurde mit 15 mL SW-Puffer (fünffaches Säulenvolumen) gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine von der Säule zu eluieren. Zur Elution wurden sechsmal 1,5 mL SE-Puffer (sechsmal 0,5 faches Säulenvolumen, Tabelle 1) verwendet. Es wurde jeweils für fünf Minuten mit Elutionspuffer inkubiert. Zur Regeneration wurde das Säulenmaterial mit 15 Säulenvolumen (45 mL) SR-Puffer (Tabelle 1) gewaschen. Zur Lagerung wurde das Säulenmaterial mit 2 mL SR-Puffer überschichtet. Die Claudin-7 Eluate wurden vereinigt, mittels eines Amicon® Ultra Zentrifugen Filters (Sigma, MWCO 10 000 Da) auf 2,5 mL eingengt und mittels einer Entsalzungssäule (siehe Kap. 3.3.4) in P-Puffer mit 5 mM DDM überführt. Anschließend wurde Claudin-7 in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### **3.3.4 Entsalzung mittels PD10-Säule**

PD10-Säulen ermöglichen es innerhalb von kürzester Zeit Salz und kleine Moleküle, wie Imidazol aus einer Lösung zu entfernen. Es handelt sich hierbei um eine Gelfiltration im kleinen Stil.

Die PD10-Säule wurde mit 25 mL Elutionspuffer (Puffer, in dem das Protein vorliegen soll) äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 mL Proteinlösung auf die Säule gegeben und vollständig ins Säulenmaterial einlaufen gelassen. Die Elution erfolgte anschließend mit 3,5 mL Puffer. Kleine Moleküle, wie Salze und Imidazol, sind nun noch auf der Säule, während große Moleküle, wie das Protein, eluiert werden. Anschließend wurde die PD10-Säule mit 75 mL VE-H<sub>2</sub>O gewaschen, um alle Salze und Pufferrückstände zu entfernen. Die PD10-Säule wurde bis zur nächsten Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### **3.3.5 Bestimmung der Protein-Konzentration**

#### **3.3.5.1 Absorption bei $\lambda = 280$ nm**

Über die Messung der Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm kann die Konzentration von gereinigtem Protein bestimmt werden. Dazu wird das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel (1)) umgestellt, um die Konzentration zu berechnen.

$$E_{280} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Dabei bezeichnet  $d$  die Schichtdicke der Probe in cm,  $c$  die Proteinkonzentration in mol/L,  $\epsilon$  den Extinktionskoeffizient des Proteins in  $\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$  und  $E_{280}$  die Extinktion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .

Mit dem Programm ExpASy ProtParam [125] wurden die Extinktionskoeffizienten für die unterschiedlichen Proteine bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine sind Tabelle 22 zu entnehmen.

**Tabelle 22:** Extinktionskoeffizienten und Proteingröße der in dieser Arbeit isolierten Proteine.

Protein	Extinktionskoeffizient $\epsilon \left[ \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$	Größe [kDa]
CurT	35 980	16,4
CurT_TM	19 480	7,7
CurT_N-term	35 980	14,3
CurT_C-term	19 480	9,8
Tetraspanin-8	26 930	27,4
Claudin-7	48 400	26,3
Claudin-7_V70A	47 900	26,3
Claudin-7_R81A	47 900	26,3
Claudin-7_F148A	47 900	26,3
Claudin-7_Y149A	46 910	26,3
Claudin-7_E160A	47 900	26,3
Claudin-7_F161A	47 900	26,3
Claudin-7_R81A_Y149A	46 410	26,2
Claudin-7'	46 410	26,1
Claudin-7*	46 910	25,9

### 3.3.5.2 BCA-Assay

Um die Proteinkonzentration während des Aufschlusses der *E. coli*-Bakterien und der Membranpreparation (siehe Kap. 3.3.1.1, 3.3.2.1, 3.3.3.1) zu bestimmen wurde der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay [126] verwendet. Hierzu wurde das *Pierce™ BCA™ Protein-Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet und der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA (Bovines Serum Albumin). In einer 96-Well Platte wurde die Extinktion des Farbstoffes bei  $\lambda = 562 \text{ nm}$  photometrisch bestimmt. Hierzu wurde der *PowerWave XS* von BioTek® verwendet. Eine Eichgerade wurde aus den Messwerten der BSA-Verdünnungsreihe erstellt. Daraus konnte die Proteinkonzentration der vermessenen Proben bestimmt werden.

### 3.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophores (PAGE)

Proteine können mittels einer SDS-PAGE im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden [127]. In dieser Arbeit wurden 18 %ige, 14 %ige oder 12 %ige Trenngele und 6 %ige Sammelgele verwendet (Tabelle 23). Es wurden Gele mit zehn oder 15 Taschen hergestellt.

**Tabelle 23:** Zusammensetzung der SDS-Acrylamidgele.

Substanz	Trenngel			Sammelgel
	12 %	14 %	18 %	6 %
H <sub>2</sub> O	4,5 mL	4 mL	3 mL	6 mL
Acrylamid 40 %	3 mL	3,5 mL	4,5 mL	1,5 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	
Sammelgelpuffer				2,5 mL
APS 10 %	100 µL	100µL	100 µL	100µL
TEMED	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL

Die Proben wurden je nach Bedarf 4:1 mit 5x SDS-Probenpuffer oder mit SDS- und DDT-freiem 5x Probenpuffer (seminalive SDS-PAGE) versetzt. Vor Verwendung wurden die Proben für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das SDS-Gel wurde in die Gelkammer eingespannt, welche mit Laufpuffer gefüllt wurde. Anschließend wurden die Proben aufgetragen. Zur Einschätzung des Molekulargewichts wurde ein Größenstandard aufgetragen. Zur Trennung der Proteine wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Ende des SDS-Gels erreicht hatte.

#### 3.3.6.1 Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Brillantblau-R250 lagert sich an basische Aminosäureseitenketten an. Dies ermöglicht die Visualisierung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel.

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in die Coomassie-Färbelösung überführt. Es folgte eine Inkubation auf dem Taumelschüttler, bis die gewünschte Färbung erreicht war. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend mittels Coomassie-Entfärbelösung entfernt. Das Acrylamidgel wurde so lange in Coomassie-Entfärbelösung auf dem Taumelschüttler inkubiert bis die gefärbten Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Zur Entfernung der Säure wurden das Polyacrylamidgel anschließend mit VE-Wasser gewaschen und zur Dokumentation eingescannt.

### 3.3.7 Western Blot-Analyse und Immunodetektion

Für eine Western Blot-Analyse wurde eine SDS-PAGE, wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 2,5 µL des Markers *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zwei Filterpapiere (Extra thick blot paper, Bio Rad, München) und eine Blot-Membran (Roti®-PVDF, Porengröße 0,45µm, Roth, Karlsruhe) wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Filterpapier wurde in Transferpuffer (Tabelle 1) getränkt. Die Blot-Membran wurde mit Methanol aktiviert. Nach Beenden der SDS-PAGE wurde das Acrylamidgel aus der Apparatur genommen und die Glasplatten entfernt. Anschließend wurde alles wie folgt in die Blot-Apparatur (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio Rad, München) geschichtet: zuerst ein Filterpapier, darauf folgte blasenfrei die Membran und anschließend das Acrylamidgel, zuletzt wurde wieder ein Filterpapier aufgelegt. Die restlichen Luftblasen wurden mit Hilfe einer Walze entfernt. Der Proteintransfer erfolgte in 30 min bei einer Spannung von 25 V. Die Membran wurde nun für eine Stunde mit Blockpuffer (Tabelle 1) auf dem Taumelschüttler inkubiert und wurde anschließend dreimalig mit TBST-Puffer gewaschen (je 10 min). Nun wurde die Membran mit His-tag-Antikörper, bzw. Erstantikörper für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen (je 10 min) mit TBTS-Puffer konnte der Blot (welcher mit His-tag-Antikörper inkubiert wurde) entwickelt werden. Bei Verwendung eines Erstantikörpers erfolgte nach dem Waschen eine einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper. Anschließend wurde erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen (je zehn Minuten).

Zur Detektion der Banden wurde die Membran nun eine Minute mit 10 mL ECL1-Puffer (Tabelle 1) inkubiert. Nach dieser Minute wurde für eine weitere Minute 10 mL ECL2-Puffer (Tabelle 1) zugegeben. Die Detektion der chemolumineszierenden Banden erfolgte anschließend mit dem Aufnahmesystem STELLA (Raytest, Staubenhardt). Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit dem Programm *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) [128].

### 3.3.8 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung von Proteinen

Um gering konzentrierte Proteine nachweisen zu können, wurden diese mittels Trichloressigsäure (engl.: *Trichloroacetic Acid*, TCA) gefällt. Auch das Entfernen von hohen Laryldimethylamin-N-oxid (LDAO)-Konzentrationen ist durch die TCA-Fällung der Proteine möglich.

Zur Proteinlösung wurde ein halbes Volumen eiskalter 50 %iger TCA-Lösung (w/v) gegeben. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min, 20 000 g, 4 °C) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 1 mL eiskaltem Aceton aufgenommen und zentrifugiert (15 min, 20 000 g, 4 °C). Erneut wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet im Abzug vollständig getrocknet. Das getrocknete Pellet

wurde in 50 - 100  $\mu\text{L}$  1x Probenpuffer aufgenommen (je nach gewünschter Konzentration). Färbte sich die Probe gelb, wurde in 1  $\mu\text{L}$  Schritten 1 M NaOH zugegeben, bis die Probe wieder blau war.

### 3.3.9 NaOH-Extraktion von Proteinen

Zur Analyse der Proteine einer pelletierten *E. coli*-Bakterienprobe, kann eine NaOH-Extraktion durchgeführt werden. Somit können z.B. in GALLEX-Experimenten die Expressionsniveaus der Konstrukte verglichen werden.

Für die NaOH-Extraktion wurde das *E. coli*-Bakterienpellet in 90  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL DNase und 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL Lysozym aufgenommen. Die Suspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden durch das Lysozym die Zellen aufgebrochen und die enthaltene DNA durch die DNase verdaut. Der Ansatz wurde eisgekühlt. 150  $\mu\text{L}$  eiskaltes  $\text{H}_2\text{O}$  wurden zugegeben und mit der Lösung gemischt. 125  $\mu\text{L}$  dieser Mischung wurde verworfen. Nun wurden 125  $\mu\text{L}$  eiskalte 0,1 M NaOH zugegeben und die Lösung für eine Minute gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min, bei 20 000  $g$  und 4  $^\circ\text{C}$ , um die Proteine zu pelletieren. Das Pellet wurde anschließend in 50  $\mu\text{L}$  1x Probenpuffer aufgenommen. Diese Probe konnte anschließend für eine Western Blot-Analyse verwendet werden.

### 3.3.10 DNase/Lysozym-Verdau

Der DNase/Lysozym-Verdau dient dem Aufbruch und DNA-Verdau von Bakterien und ermöglicht es so, dass Proteine für eine Detektion in der SDS-PAGE-Analyse, bzw. der Western Blot-Analyse besser zugänglich sind.

Für den DNase/Lysozym-Verdau wurde das *E. coli*-Bakterienpellet in 2,5  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL DNase, 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL Lysozym, 10  $\mu\text{L}$  100 mM  $\text{CaCl}_2$  und 57,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Die Suspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden durch das Lysozym die Zellen aufgebrochen und die enthaltene DNA durch die DNase verdaut. Nach der Inkubation wurden 20  $\mu\text{L}$  5x Probenpuffer zugegeben. Die so behandelte Probe konnte anschließend für eine SDS-PAGE- oder Western Blot-Analyse verwendet werden.

### 3.3.11 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)

Zur Analyse der Claudin-7 Oligomergröße wurde eine analytische Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Es wurde das ÄKTApurifier System mit der Säule

Superose™ 12 10/300 GL (GE Healthcare) verwendet. Die Säule wurde mit P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) nach Herstellerangaben äquilibriert. Es wurde 500 µL Proteinlösung (33 µM) nach der Proteinreinigung mittels IMAC auf die Säule geladen. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min. Die Proteindetektion erfolgte über die die Tryptophan-Absorption bei 280 nm und die Phenylalanin-Absorption bei 254 nm.

### 3.3.12 SDS-Titration

Mittels der SDS-Titration kann die Entfaltung und Stabilität von Membranproteinen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) untersucht werden. Die SDS-Titration beruht auf der Methode von Lau und Bowie [129]. Das anionische Detergenz SDS wird in ansteigender Konzentration zum Membranprotein in Detergenz-Mizellen (hier in n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM)) gegeben. Dadurch bilden sich gemischte Mizellen aus, wodurch SDS seine destabilisierende Wirkung auf das Protein in den Mizellen (hier Claudin-7) ausbilden kann. Da nicht genau bestimmt werden kann wieviel SDS sich in den gemischten Mizellen befindet, wird hier mit dem Molenbruch  $\chi(\text{SDS})$  gearbeitet (Formel (2)),  $c_{\text{SDS}}$  bezeichnet die Konzentration von SDS,  $c_{\text{DDM}}$  bezeichnet der Konzentration an DDM), welcher das Verhältnis zwischen dem Gesamtdetergenz in der Probe und SDS angibt. Der experimentell bestimmte Anteil an SDS in den gemischten Mizellen kann mir dem durch den Molenbruch angegebenen Anteil verglichen werden [130].

$$\chi(\text{SDS}) = \frac{c_{\text{SDS}}}{(c_{\text{SDS}} + c_{\text{DDM}})} \quad (2)$$

In diesem Fall wurde die SDS-Titration zur Entfaltung von Claudin-7 und dessen Oligomeren verwendet. Dazu wurde isoliertes Claudin-7 in P-Puffer (Tabelle 1) und 5 mM DDM verwendet. Die Titrationsreihe wurde durch Verdünnung einer 500 mM SDS-Lösung (in P-Puffer mit 5 mM DDM) hergestellt (vgl. Tabelle 24). Dazu wurden 162 µL Claudin-7 mit einer Konzentration von 4 µM gegeben, sodass sich final eine Konzentration von 3,2 µM im Gesamtvolumen von 200 µL ergab. Die Ansätze wurden mehrfach invertiert und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden Ansätze für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Ansätze mittels Fluoreszenzspektroskopie (siehe Kap. 3.5.1) analysiert und 12 µL des Titrationsansatzes wurden mit 3 µL 5x Probenpuffer versetzt und einer seminativer SDS-PAGE-Analyse (kein SDS im Probenpuffer, siehe Kap. 3.3.6) unterzogen.

**Tabelle 24:** Molenbrüche und zugehörige SDS-Konzentrationen der verwendeten Titrationsansätze.

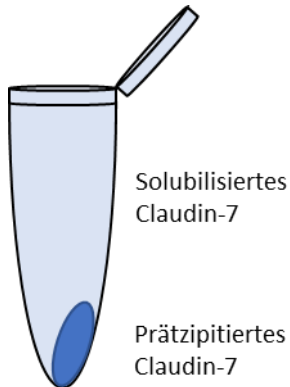
$\chi(\text{SDS})$	$c_{\text{SDS}}$ [mM]
0,00	0,00
0,04	0,21
0,08	0,43
0,12	0,68
0,16	0,95
0,20	1,25
0,24	1,58
0,28	1,94
0,32	2,35
0,36	2,81
0,40	3,33
0,44	3,93
0,48	4,62
0,52	5,42
0,56	6,36
0,60	7,50
0,64	8,89
0,68	10,63
0,72	12,86
0,76	15,83
0,80	20,00
0,84	26,25
0,88	36,67
0,92	57,50
0,95	95,00

### 3.3.13 Test auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Claudin-7-Monomeren

Um elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Claudin-7-Monomeren zu untersuchen, wurde Claudin-7 in Puffer mit unterschiedlichen Salz-Konzentrationen dialysiert. Ein hoher Salz-Gehalt unterdrückt elektrostatische Wechselwirkung. Wird der Salzgehalt reduziert, so steigt der Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen.

Für diesen Versuch wurde eine Proteinreinigung nach Kapitel 3.3.3 in n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) durchgeführt. Anschließend wurde jeweils 1 mL Claudin-7-Eluat 1:100 in unterschiedliche Puffer dialysiert. Zur Kontrolle diente P-Puffer (Tabelle 1). Des Weiteren wurden die Puffer S2-S10 (stets 50 mM Phosphat, pH 8) mit stetig reduzierten NaCl-Gehalt (300 mM NaCl – 0 mM NaCl) verwendet. Als Dialyseschlauch wurde die Dialysemembran Spectra/Por® MWCO 12 000 – 14 000 kDa (Roth, Karlsruhe) verwendet.

Der Dialysepuffer wurde zweimal nach jeweils einer Stunde gewechselt. Anschließend wurde über

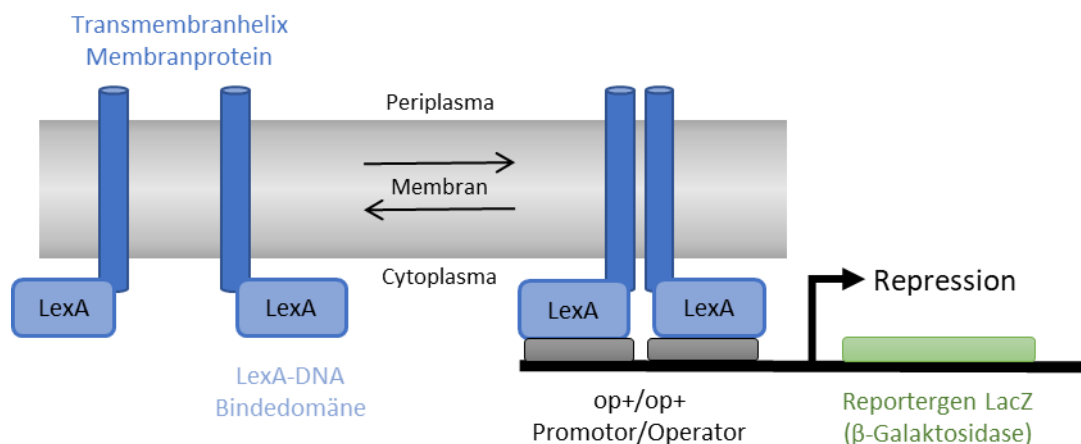


**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Präzipitation von Claudin-7.

Nacht weiter dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der Inhalt des Dialyseschlauches in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1 min, 20 000 g, RT) um präzipitiertes Protein zu pelletieren. Vom Überstand (solubilisiertes Claudin-7) wurde eine Probe für die SDS-PAGE-Analyse (siehe Kap. 3.3.6) genommen. Der restliche Überstand wurde komplett entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 100 µL 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und ebenfalls einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Die Monomerbande auf dem gefärbten Acrylamidgel wurde anschließend mit dem Programm *ImageJ* [128] ausgewertet und auf die Probe in P-Puffer normiert.

### 3.3.14 GALLEX-Experiment

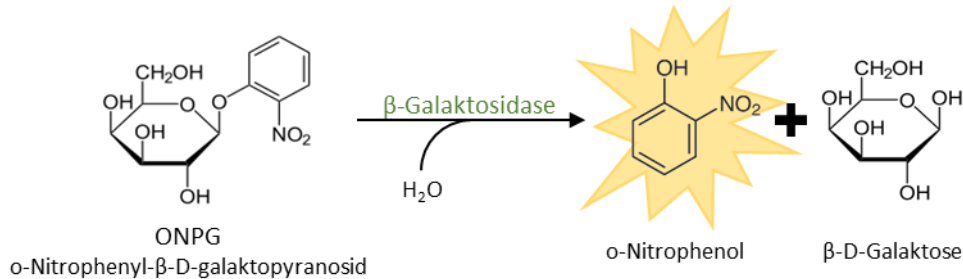
Die Oligomerisierung von Membranproteinen oder einzelner Transmembranhelices kann mittels des GALLEX-Systems detektiert werden [131–133]. Zunächst wird hierzu eine N-terminale LexA-DNA-Bindedomäne an das zu untersuchende Membranprotein, bzw. die Transmembranhelix fusioniert. Dieses Konstrukt wird dann in den *E. coli*-Stamm SU101 transformiert. Durch die Dimerisierung zweier LexA-DNA-Bindedomänen können diese an den *op*<sup>+</sup>/*op*<sup>+</sup> Operator/Promoter des LacZ-Gens binden. Diese Bindung führt zu einer Repression des LacZ-Gens, welches für die β-Galaktosidase codiert (Abbildung 9) [134].



**Abbildung 9:** Funktionsweise des GALLEX-Systems.

Bei einer Dimerisierung der Transmembranhelices/Membranproteine kommt es zur Dimerbildung der LexA-Bindedomäne. Das LexA-Dimer bindet dann an den *op*<sup>+</sup>/*op*<sup>+</sup> Operator/Promoter des LacZ-Gens, welches infolgedessen einer Repression unterliegt.

Die Detektion der Oligomerisierung erfolgt photometrisch, indem die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase über die Messung der Absorption bei 420 nm und 550 nm detektiert wird [135]. Die durch die  $\beta$ -Galaktosidase katalysierte Reaktion ist in Abbildung 10 dargestellt. Durch die Umsetzung des *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) entsteht das gelbe *o*-Nitrophenol und  $\beta$ -D-Galaktose.



**Abbildung 10: Reaktionskatalyse der  $\beta$ -Galaktosidase.**

ONPG wird durch die  $\beta$ -Galaktosidase in *o*-Nitrophenol und  $\beta$ -D-Galaktose gespalten. *o*-Nitrophenol ist gelb und kann über seine Absorption detektiert werden.

Die Stärke der Interaktion kann anschließend über die Berechnung der  $\beta$ -gal *units* ermittelt werden (Formel (3)). Je niedriger dieser Wert ist, desto stärker ist die Interaktion zwischen den Transmembranhelices/Membranproteinen. Als Positivkontrolle dient die Transmembranhelix des Glycophorin A. Als Negativkontrolle wird der Leervektor pMalp2 verwendet.

$$\beta\text{-gal units} = \frac{(1000 \cdot OD_{420}) - (1,75 \cdot OD_{550})}{t [\text{min}] \cdot 0,1 \text{ mL} \cdot OD_{600}} \quad (3)$$

Die Transformation der SU101-Bakterien mit den LexA-Konstrukten wurde analog zu Kapitel 3.2.2 durchgeführt. Es wurden stets drei Einzelkolonien für einen Versuch verwendet. Anschließend folgte eine Kultivierung in 4 mL LB-Medium (37 °C, 200 rpm, ÜN) mit Ampicillin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Chloramphenicol 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und Kanamycin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die Hauptkultur (10 mL LB-Medium, Ampicillin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Chloramphenicol 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und Kanamycin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sowie IPTG in der ermittelten Konzentration (siehe Ergebnisteil Kap. 4.2.2.1, 4.3.1.1)) wurde am folgenden Morgen mit 250  $\mu\text{L}$  der Vorkultur inokuliert. Die Hauptkultur wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa 0,6 im Schüttelinkubator kultiviert, zur Ermittlung der  $OD_{600}$  wurde 1 mL der Bakteriensuspension abgenommen. 100  $\mu\text{L}$  der Bakteriensuspension wurden zu 900  $\mu\text{L}$  1x Z-Puffer (Tabelle 1, immer frisch ansetzen und steril filtrieren) gegeben. Um die Bakterien zu lysieren wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 0,1 %igen SDS-Lösung und 12  $\mu\text{L}$  Chloroform zugegeben und anschließend wurden die Proben durch intensives Schütteln gemischt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Reaktion wurde durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  ONPG-Lösung (4 mg/mL) gestartet. Durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung wurde die Reaktion nach ausreichender Gelbfärbung der Negativkontrolle gestoppt. Die Reaktionszeit (hier 6 min) wurde dabei

für alle Proben beibehalten. Die Proben wurden für eine Minute bei 20 000 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde die Absorption des Überstands bei einer Wellenlänge von 420 nm und 550 nm bestimmt und die  $\beta$ -gal *units* nach Formel (3) berechnet.

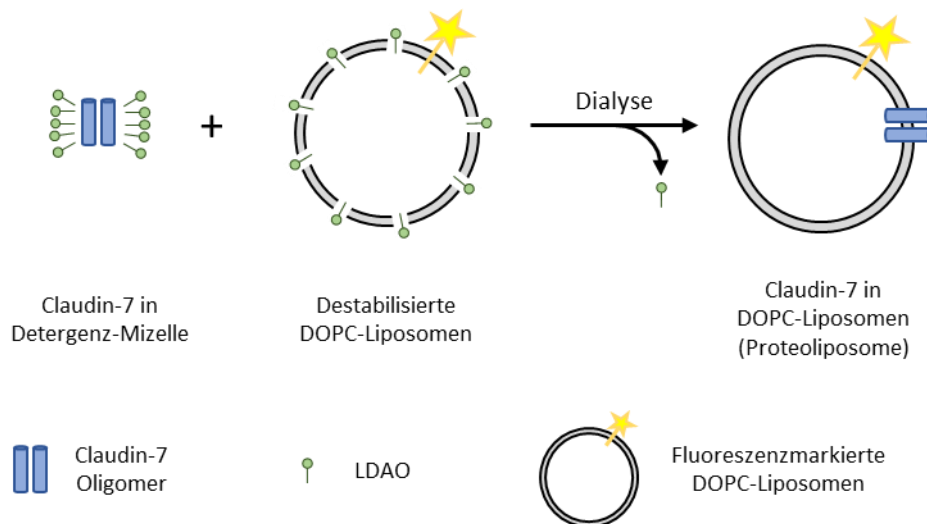
### **3.3.15 Rekonstitution von CurT in DOPC/DOPG-Liposomen**

Die Rekonstitution von CurT in DOPC/DOPG-Liposomen wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Nadja Hellmann durchgeführt.

Zur Herstellung destabilisierter Liposomen wurden die entsprechende Menge in Chloroform gelöstes Lipid, 70 Mol-% Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) und 30 Mol-% Dioleoylphosphatidylglycerin (DOPG) mit einer Hamilton-Spritze in einen 50 mL Glaskolben überführt, sodass die finale Lipidkonzentration bei Zugabe von 1 mL N-Puffer (Tabelle 1) 4 mM entsprach. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte unter einem Stickstoff-Strom und Rückstände wurden über Nacht im Vakuum-Exsikkator beseitigt. Mittels N-Puffer wurde der Lipidfilm rehydratisiert und für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Die Liposomen wurden durch Zugabe von 4 mM Triton-X destabilisiert. 260  $\mu$ L destabilisierte Liposomen (2 mM Lipid, 4 mM Triton-X) und 40  $\mu$ L CurT in 5 mM DDM in drei verschiedenen Konzentrationen wurden zusammengegeben, sodass das Protein:Lipid Verhältnis 1:680, 1:340 und 1:85 betrug, die DDM-Konzentration blieb dabei konstant. Die Inkubation erfolgte für 20 min auf dem Schüttelinkubator. Die Entfernung der Detergenzien (DDM und Triton) erfolgte nach Geertsma *et al.* [136]. Dazu wurden 12 mg Bio-Beads™ SM-2 (BioRad, München) zur Lipid-Protein-Lösung gegeben und für 30 min bei 4 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden erneut 12 mg Bio-Beads™ zugegeben und für 2,5 h bei 4 °C inkubiert. Weitere 12 mg Bio-Beads™ wurden zugegeben und die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden erneut 12 mg Bio-Beads™ zugegeben und für weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Bio-Beads™ wurden durch Zentrifugation (10 min, 13 000 *g*, Raumtemperatur) sedimentiert und es wurden 100  $\mu$ L Probe aus dem Überstand entnommen und am Elektronen-Mikroskop von Dr. Frank Depoix vermessen.

### **3.3.16 Rekonstitution von Claudin-7 in DOPC-Liposomen**

Die Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO)-Konzentration bei der Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen destabilisiert werden, wurde nach Geertsma *et al.* und Knol *et al.* bestimmt [136, 137]. DOPC-Liposomen mit einer Konzentration von 1,5 mg/mL wurden mit 6 mM LDAO destabilisiert. Eine schematische Darstellung der Rekonstitution von Claudin-7 ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Claudin-7 Rekonstitution in DOPC-Liposomen.**

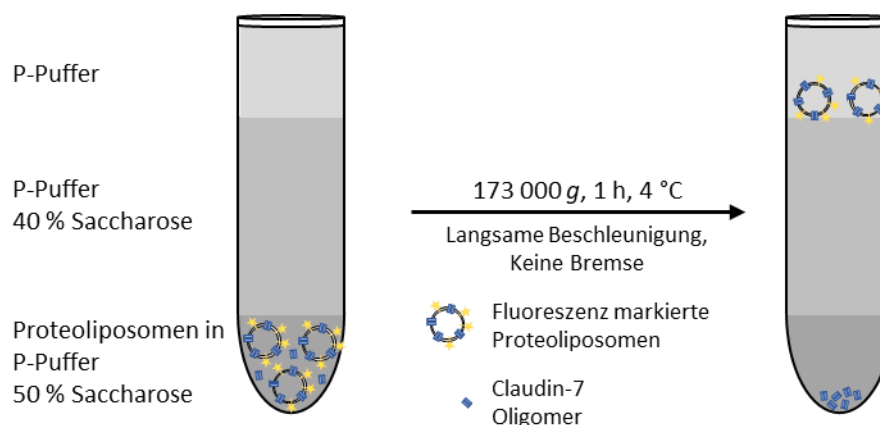
Claudin-7 in Detergenz-Mizellen wird mit destabilisierten, fluoreszenzmarkierten DOPC-Liposomen gemischt. Durch Dialyse wird das Detergenz (LDAO) aus der Lösung entfernt und Claudin-7 wird in die Liposomen integriert.

Zur Herstellung der destabilisierten Liposomen (finale Lipidkonzentration 2 mM) wurde das benötigte Volumen an in Chloroform gelöstem DOPC (25 g/L Stammlösung) mit einer Hamilton-Spritze in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde entweder der Farbstoff 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Ammonium Salz) (LissRhod-PE, 0,1 g/L Stammlösung) oder 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (Ammonium Salz) (NBD-PE, 0,1 g/L Stammlösung) mit einer Konzentration von 0,1 % (Molprozent) zugegeben. Das Chloroform wurde unter einem Stickstoff-Strom entfernt. Die Entfernung von Lösungsmittelrückstände erfolgte über Nacht im Vakuum-Exsikkator. Der Lipidfilm wurde in P-Puffer (Tabelle 1) mit 6 mM LDAO hydratisiert. Das Reaktionsgefäß wurde für zehn Minuten gevortext und fünf Zyklen aus Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und wieder auftauen bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden in einem Protein zu Lipid Verhältnis von 1:400 die destabilisierten Liposomen mit in LDAO solubilisiertem Claudin-7 versetzt. Damit Claudin-7 in den destabilisierten Liposomen rekonstituiert und LDAO entfernt wird, wurde 1:1 000 gegen P-Puffer bei 4 °C dialysiert. Dabei wurde die Dialysemembran Spectra/Por® Biotech CE MWCO 20 000 (Roth, Karlsruhe) verwendet. Der Dialysepuffer wurde zweimal nach je einer Stunde gewechselt und der letzte Dialyseschritt erfolgte über Nacht. Die Proteoliposomen wurden für eine Minute bei 20 000 g, bei Raumtemperatur zentrifugiert, um eventuell entstandene Aggregate abzutrennen. Bis zur Verwendung der Proteoliposomen wurden diese im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und stets am Tag der Herstellung verwendet.

### 3.3.17 Diskontinuierlicher Saccharose-Gradient zur Überprüfung der Rekonstitution

Um die Rekonstitution von Claudin-7 in Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen zu analysieren wurde ein diskontinuierlicher Saccharose-Gradient verwendet. Dabei wurde nach Pernstich *et al.* verfahren [138]. Das Prinzip beruht darauf, dass Proteoliposomen eine geringere Dichte aufweisen als aggregierte Proteine. Somit schwimmen Proteoliposomen auf der Saccharose-Schicht, während aggregierte Proteine in der Schicht mit der höchsten Saccharose-Konzentration pelletiert werden (Abbildung 12).

Für einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten wurden 100  $\mu\text{L}$  Proteoliposomen (siehe Kap. 3.3.16) mit 200  $\mu\text{L}$  P-Puffer (Tabelle 1) und 1,7 mL 60 %ige Saccharose in P-Puffer (w/v) gemischt, sodass die Probe final in 50 %iger Saccharose vorlag. 2 mL P-Puffer wurden im Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 8 mL 40 %iger Saccharose in P-Puffer (w/v) unterschichtet. Anschließend wurde die Proteoliposomen Probe (2 mL, 50 % Saccharose) unterschichtet. Die Proben wurden für eine Stunde bei 173 000  $g$  und 4  $^{\circ}\text{C}$  im SW40-Rotor zentrifugiert, wobei die Beschleunigung auf ein Minimum und die Bremse ausgeschaltet wurde, um eine Durchmischung der Schichten zu verhindern. Nach der Zentrifugation wurden von oben 0,5 mL-Aliquots abgenommen und die fluoreszenzmarkierten Proteoliposomen wurden am Fluorimeter analysiert. Die Fraktion der Liposomen und somit die Lokalisation im Saccharose-Gradient konnte damit bestimmt werden. Anschließend wurden die Proteine in den Fraktionen mittels TCA gefällt (siehe Kap. 3.3.8) und einer Western Blot-Analyse unterzogen (siehe Kap. 3.3.7). Dies ermöglichte die Detektion von Claudin-7 und dessen Lokalisation im Saccharose-Gradient. Konnten Liposomen und Claudin-7 in denselben Fraktionen detektiert werden, war die Rekonstitution erfolgreich.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Prinzips eines diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten.**

Dargestellt ist das Prinzip eines diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten bei Beladung mit fluoreszenzmarkierten Claudin-7 Proteoliposomen. Auf der linken Seite ist die Start Situation dargestellt. Die Proteoliposomen wurden in einer 50 %igen Saccharose-Lösung (w/v) unter einer 40 %igen Saccharose und einer Puffer-Schicht in den Gradienten eingebracht. Durch Zentrifugation wandern die Proteoliposomen im Gradient nach oben und schwimmen auf der 40 %igen Saccharose-Schicht, während bei der Rekonstitution entstandene Aggregate pelletiert in der 50 %igen Saccharose-Schicht vorliegen.

### 3.4 Programme zur Strukturvorhersage von Proteinen

Die verwendeten Programme zur Sequenzanalyse, Strukturvorhersage und Strukturanalyse sind mit Hinweisen auf die Literatur in Tabelle 25 aufgeführt.

**Tabelle 25:** Verwendete Programme zur Strukturvorhersage von Proteinen.

Verwendung	Protein	Programm	Literaturverweise
Sequenzvergleich	CurT tRip	T-Coffee-Server	[139, 140]
Hydrophobizität	tRip	ProtScale	[125, 141]
Sekundärstruktur	tRip	TMHMM-Server PredictProtein	[142, 143] [144]
Tertiärstruktur	Claudin-7	Raptor-X USCF Chimera	[145] [146]

### 3.5 Biophysikalische Methoden

#### 3.5.1 Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin können Proteine fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden. Die drei Aminosäuren haben aromatische Seitenketten, welche nach Anregung mit UV-Licht fluoreszieren. Tryptophan erreicht dabei die größte Quantenausbeute und bestimmt dadurch den Großteil der Fluoreszenz eines Proteins. Veränderungen der Polarität in der lokalen Umgebung eines Tryptophans können über die Tryptophan-Fluoreszenz detektiert werden [147]. Dabei kann es zu einer Veränderung der Intensität des Tryptophan-Spektrums und zu einer Verschiebung des Intensitätsmaximums kommen. Wenn Tryptophan in eine hydrophobe Umgebung exponiert wird, verschiebt sich das Fluoreszenz-Spektrum zu kleineren Wellenlängen mit einer erhöhten Fluoreszenz [148]. Bei lediglich 1 mol% der Aminosäuren in einem Protein handelt es sich um Tryptophan, daher eignet sich Tryptophan als Sensor für Strukturveränderungen in dessen Umgebung [147]. Aufgrund der genannten Eigenschaften von Tryptophan kann die Tryptophan-Fluoreszenz genutzt werden, um strukturelle Veränderungen zu detektieren [129, 149].

Zur Untersuchung der Stabilität von Claudin-7 wurde das Protein steigenden Konzentrationen Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) ausgesetzt (siehe Kap. 3.3.12). Die Probe wurde bei einer  $\lambda = 280$  nm mit einer Spaltbreite von 2 nm angeregt und das Spektrum in einem Wellenlängen-Bereich von 290 nm bis 450 nm mit einer Spaltbreite von 2 nm aufgenommen. Bei der Untersuchung von Membranproteinen wird häufig die mittlere Wellenlänge  $\langle\lambda\rangle$  (engl.: *average emission wavelength, spectral center of mass*) verwendet [150, 151], diese gibt die Verschiebung des

Spektrums wieder unter Berücksichtigung der Änderung der Form und der Position des Spektrums mit einbezogen[152].

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda \cdot I}{\sum I} \quad (4)$$

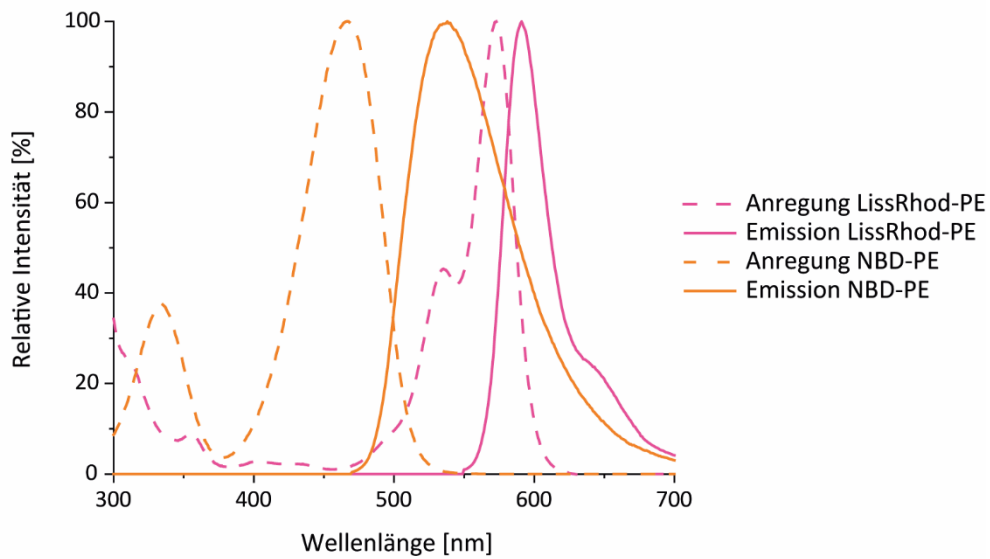
Die mittlere Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  wird nach Formel (4) berechnet, dabei steht  $\lambda$  für die Wellenlänge in nm und  $I$  für die Fluoreszenzintensität.

### 3.5.2 Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Assay

Zur Analyse der Claudin-7 Kopfgruppeninteraktion wurde ein Assay entwickelt, welcher auf dem System des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) basiert. Claudin-7 wurde in 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine-rhodamine-B-sulfonyl) (Ammonium Salz) (LissRhod-PE) und in 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (Ammonium Salz) (NBD-PE) fluoreszenzmarkierten Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Proteoliposomen rekonstituiert. Die Fluorophore bilden in räumlicher Nähe ein FRET-Paar aus und es kann zu einer strahlungsfreien Energieübertragung vom Donor (NBD-PE) auf den Akzeptor (LissRhod-PE) erfolgen. Die Energie wird dabei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen [153]. Für die Effizienz des FRET ist zusätzlich zur räumlichen Nähe die Orientierung der Dipole entscheidend [154]. Um ein FRET-Paar auszubilden, muss das Anregungsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen (Abbildung 13).

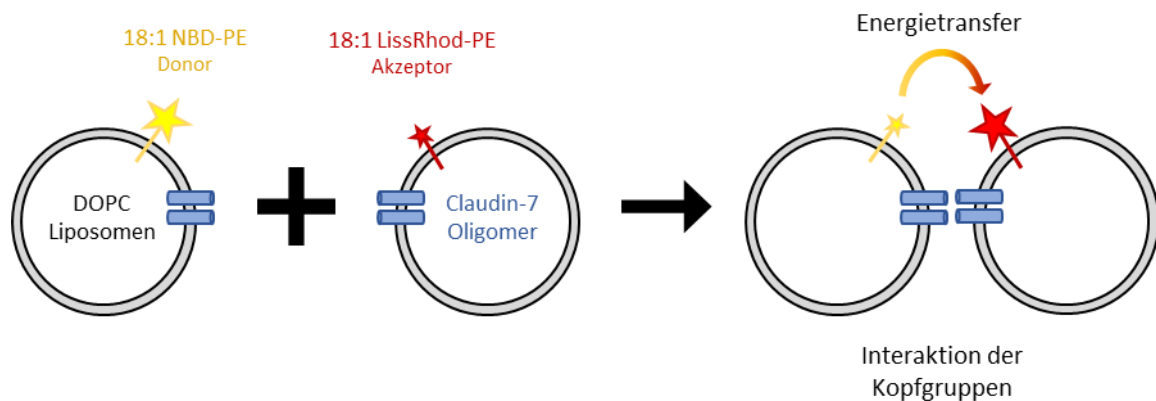
Es wurde die Veränderung der Akzeptorfluoreszenz bei  $\lambda = 590$  nm beobachtet. Bei Ausbildung einer Claudin-7 Kopf-zu-Kopf-Interaktion, bildet sich ein FRET-Paar aus und die Akzeptorfluoreszenz wird messbar. Dies ist möglich, da die Proteoliposomen durch einen Kopfgruppeninteraktion, näher als 5 nm zusammengebracht werden [155]. Eine schematische Darstellung des FRET-Assays ist in Abbildung 14 dargestellt.

Zur Untersuchung der *trans*-Interaktion von Claudin-7 und Claudin-7\* wurden Proteoliposomen, wie in Kapitel 3.3.16 beschrieben, hergestellt. Zur Kontrolle dienten Liposomen, die auf dieselbe Weise hergestellt wurden. Nach Beenden der Dialyse wurden 60  $\mu$ L LissRhod-PE Proteoliposomen mit 60  $\mu$ L NBD-PE Proteoliposomen gemischt. Aus dieser Lösung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine 10  $\mu$ L Probe entnommen und mit 190  $\mu$ L P-Puffer (Tabelle 1) versetzt. Mit den fluoreszenzmarkierten Liposomen wurde ebenso verfahren. Für jede Probe wurden zwei Spektren aufgenommen (Tabelle 26).



**Abbildung 13: Anregungs- und Emissionsspektren von LissRhod-PE und NBD-PE.**

Dargestellt sind die Anregungsspektren (gestrichelte Linie), sowie die Emissionsspektren (durchgezogene Linie) von LissRhod-PE (pink) und NBD-PE (orange). Eine Überlagerung des Emissionsspektrums von NBD-PE mit dem Anregungsspektrum von LissRhod-PE ist klar zu erkennen [156].



**Abbildung 14: Schematische Darstellung des FRET-Assays zur Bestimmung der *trans*-Interaktion von Claudin-7.**

Kommt es zu einer Kopf-zu-Kopf-Interaktion zwischen den Claudin-7 Oligomeren (blau), so werden die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DOPC-Proteoliposomen (schwarz) in räumliche Nähe gebracht. Somit kommt es zu einem Energieübertrag zwischen Donor (NBD-PE, gelb) und Akzeptor (LissRhod-PE, rot). Bei einer Interaktion ist eine steigende Akzeptorfluoreszenz zu beobachten.

**Tabelle 26:** Verwendete Parameter zur Ermittlung des FRET-Signals.

Parameter	NBD-PE Anregung	LissRhod-PE Anregung
Temperatur	25 °C	25 °C
Anregungswellenlänge	460 nm	560 nm
Gemessener Wellenlängenbereich	475 nm – 700 nm	570 nm – 700 nm
Spaltbreite	5 nm	3 nm

Zur Kontrolle wurden die Spektren der NBD-PE-Proteo-/Liposomen und der LissRhod-PE-Proteo-/Liposomen aufgenommen. Dazu wurden 5 µL der Proteo-/Liposomen mit 195 µL P-Puffer

versetzt und entsprechend Tabelle 26 Spektren aufgenommen. Um die geringe Anregung von LissRhod-PE bei einer Anregung bei  $\lambda = 460$  nm zu berücksichtigen wurde mittels des Emissionsspektrums der Donor-Akzeptor-Mischung bei einer Anregung von  $\lambda = 560$  nm im Vergleich zum alleinigen LissRhod-PE-Spektrum bei einer Anregung von  $\lambda = 560$  nm ein Faktor (Formel (5)) ermittelt, mit dem das alleinige LissRhod-PE-Spektrums bei einer Anregung bei  $\lambda = 460$  nm gewertet wurde.

$$\text{Faktor} = \frac{I_{590, \text{DA}}}{I_{590, \text{D}}} \quad (5)$$

Das gewertete LissRhod-PE-Spektrum wurde vom gemessenen Donor-Akzeptor-Spektrum bei einer Anregung bei  $\lambda = 460$  nm abgezogen, um das Hintergrundrauschen zu eliminieren. Anschließend konnte durch Normierung des NBD-PE-Spektrums die Akzeptorfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm ermittelt werden (Formel (6)). Dabei gibt  $I_{590, \text{DA}}$  die Intensität der Fluoreszenz im Donor-Akzeptor-Gemisch bei einer Wellenlänge von 590 nm an und  $I_{590, \text{D}}$  die Intensität des Donors im normierten Donor-Spektrum bei einer Wellenlänge von 590 nm.

$$I_{\text{Akzeptor}} = I_{590, \text{DA}} - I_{590, \text{D}} \quad (6)$$

Zur Ermittlung der ratiometrischen FRET-Effizienz  $E_{\text{rat}}$  (Formel (7)) wird die Donorfluoreszenz bestimmt, welche der Intensität des Donor-Akzeptor-Gemisches bei einer Wellenlänge von 525 nm ( $I_{\text{Donor}} = I_{525, \text{DA}}$ ) entspricht.

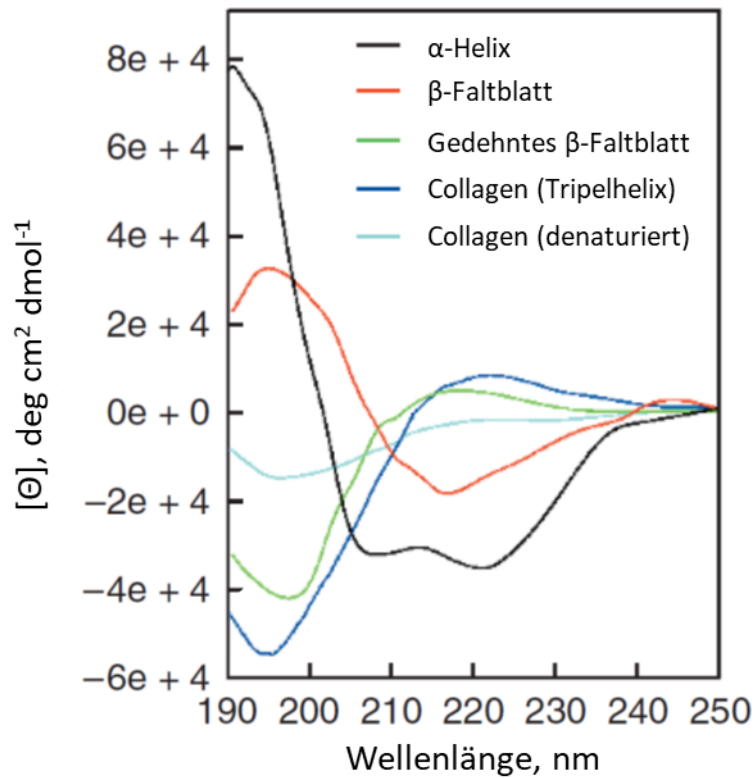
$$E_{\text{rat}} = \frac{1}{1 + \left( \frac{I_{\text{Donor}}}{I_{\text{Akzeptor}}} \right)} \quad (7)$$

### 3.5.3 Zirkulardichroismus (engl.: *circular dichroism*, CD)-Spektroskopie

Zirkular polarisiertes Licht besteht aus rechts- und linksdrehendem polarisiertem Licht. Optisch aktive Substanzen absorbieren das zirkulär polarisierte Licht unterschiedlich. Dieser Absorptionsunterschied kann Zirkulardichroismus (engl.: *circular dichroism*, CD)-spektroskopisch betrachtet werden. Je nach Faltung des Proteins unterscheidet sich die Absorption der Peptidbindungen. Dies hilft Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur von Proteinen zu ziehen. In Abbildung 15 sind die CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturen dargestellt [5, 157].

Hoppe *et al.* [158] definierte den molaren CD-Wert  $\Delta\epsilon$  (Formel (8)).

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \frac{\Delta A(\lambda)}{l \cdot c} \quad (8)$$



**Abbildung 15: Charakteristische CD-Spektren für Sekundärstrukturelemente.**

Es sind die CD-Spektren (molare Elliptizität  $\theta$ ) verschiedener Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helix (schwarz),  $\beta$ -Faltblatt (rot), gedehntes  $\beta$ -Faltblatt (grün), Collagen Tripelhelix (blau) und denaturiertes Collagen (hellblau)) im oberen UV-Bereich (Wellenlänge  $\lambda = 190 - 250$  nm) dargestellt. Verändert nach [157].

Dabei bezeichnet  $\Delta A$  die Differenz in der Absorption des zirkulär polarisierten Lichts,  $l$  die optische Weglänge in cm und  $c$  die Konzentration der Probe in mol/L. Der molare CD-Wert wird häufig als Elliptizität  $\theta$  in Grad (*degree*, deg) angegeben (Formel (9)) [158].

$$\theta(\lambda) = 3298,2 \cdot \Delta \epsilon(\lambda) \quad (9)$$

### 3.5.3.1 Messung einzelner CD-Spektren

Die Messung der CD-Spektren erfolgte in Suprasil Quarzglas-Küvetten (Länge 1 mm) mit 4  $\mu\text{M}$  Protein. Die Messparameter sind in Tabelle 27 aufgelistet.

**Tabelle 27:** Messparameter für einzelne CD-Spektren.

Parameter	Wert
Temperatur	25 °C
Messschritt	1 nm
Bandbreite	5 nm
Scangeschwindigkeit	50 nm/min
Wiederholungen	3
D.I.T. ( <i>data integration time</i> )	1 min

### 3.5.3.2 Thermische Denaturierung von Claudin-7 und Claudin-7\*

Mittels CD-Spektroskopie kann die thermische Stabilität von Proteinen, über die Änderung der Sekundärstruktur, bestimmt werden. Dazu wurden CD-Spektren von je 4  $\mu\text{M}$  Claudin-7 und Claudin-7\* in einem Temperaturbereich von 15 °C -95 °C und in einem Wellenlängenbereich von 210 – 250 nm aufgenommen. Die Messparameter dieser thermischen Denaturierung sind in Tabelle 28 aufgeführt.

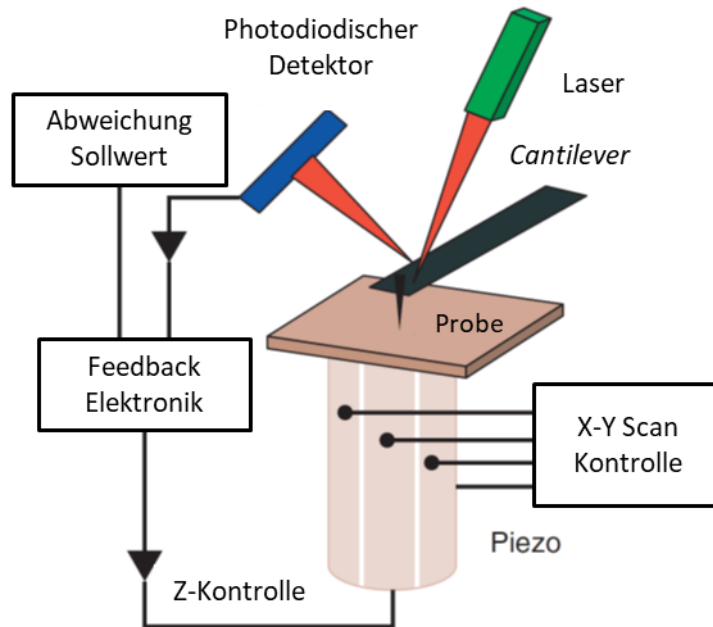
**Tabelle 28:** Messparameter für die thermische Denaturierung.

Parameter	Wert
Temperaturgradient	15 °C – 95 °C
Messschritte	1 nm
Heizrate	2 °C/min
Haltezeit	5 s

### 3.5.4 Atomic force Microscopy (AFM)

*Atomic force microscopy* (AFM, Rasterkraftmikroskopie) eignet sich für die Untersuchung von biologischen Membranen [159]. Dabei wird mit einer nanoskopisch feinen Spitze an einer Blattfeder (*Cantilever*) die zu untersuchende Oberfläche abgetastet. Auf die Spitze des *Cantilevers* wird ein Laserstrahl ausgerichtet, welcher auf einen photodiodischen Detektor reflektiert wird. Verändert sich der Reflektionswinkel, aufgrund einer Veränderung in der Höhe der Probe, wird dies detektiert und Höhenverhältnisse können wiedergegeben werden. Dabei wird entweder der *Cantilever* oder der Probenstisch bewegt, um die Kraft, welche auf die Probe wirkt, konstant zu halten [160]. In dieser Arbeit wurde der Arbeitsmodus *PeakForce Tapping* verwendet. Der *Cantilever* tippt in diesem Modus periodisch auf die Probe und die Interaktionskraft wird über die Reflektion am *Cantilever* gemessen. Über einen Rückkopplungskreislauf kann die einwirkende Kraft unter Idealbedingungen auf unter

10 pN gehalten [161]. Mittels AFM können biologische Proben sowohl an der Luft als auch in wässriger Umgebung gemessen werden. Sogar ganze Zellen, wie rote Blutkörperchen können mittels AFM untersucht werden [162].



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops (engl.: *Atomic force microscope, AFM*), verändert nach [160].

Die zu untersuchende Oberfläche wird durch eine feine Spitze am *Cantilever* in Reihen abgetastet. Die Höhe der Probe wird über den Reflektionswinkel des Lasers auf dem *Cantilever* bestimmt.

Die AFM-Aufnahmen in dieser Arbeit wurden in Kooperation mit Dr. Benedikt Junglas durchgeführt. Claudin-7 und Claudin-7\* Proteoliposomen (siehe Kap. 3.3.16) wurden im AFM untersucht. Zu Beginn wurde auf das frisch gespaltene Muskovit Mica V1 (12 mm Durchmesser, Ted Pella) 50  $\mu$ L Spülpuffer (50 mM  $MgCl_2$ ) gegeben und dreimal mit je 50  $\mu$ L Spülpuffer gewaschen. Anschließend wurden 50  $\mu$ L der Proteoliposomen, bzw. Liposomen auf das Mica gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht an das Mica gebundene Proteoliposomen/Liposomen wurden durch zehnmaliges Waschen mit je 50  $\mu$ L P-Puffer (Tabelle 1) entfernt. Im letzten Waschschrift wurde der Puffer bis auf etwa 20  $\mu$ L entfernt und die Proteoliposomen-, bzw. Liposomen-Probe. wurden mit einem Bruker Multimode 8 AFM mit *Nanoscope V Controller* im *ScanAsyst Fluid mode* analysiert. Als *Cantilever* wurde der Bruker SNL-10 A (Resonanzfrequenz  $f_0 = 65$  kHz, Federkonstante  $k = 0,35$  N/m) mit einer 2 nm Spitze verwendet. Weitere Messparameter sind in Tabelle 29 aufgeführt. Um Strukturen auf der Oberfläche ideal abbilden zu können, müssen die Scanparameter laufend an die Probenbeschaffenheit angepasst werden. Mit dem Programm GWYDDION [163] wurden die Aufnahmen bearbeitet und die gemessenen Höhenprofile wurden, nach Abzug des polynomialen Hintergrunds, gewertet. Scan-Reihen wurden mit der *trimmed mean* Methode ausgerichtet. Zuletzt

wurden die Bilder auf 2048x2048 px hochskaliert indem der Interpolations Typ „Schaum“ verwendet wurde.

### **3.6 Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Auftrennung und Analyse von Substanzgemischen kann über eine Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgen. Die Trennung der Substanzen erfolgt auf einer mit Kieselgel beschichteten Glasplatte. Das Laufmittel beeinflusst die Auftrennung hinsichtlich der Laufweite polarer und unpolarer Stoffe.

Die rekonstituierten Proteoliposomen wurden nach der Dialyse mittels DC auf verbliebenes Detergenz überprüft. Hierzu wurde ein Gemisch aus Chloroform:Methanol:Wasser im Verhältnis 6,5:2,5:0,3 als Laufmittel verwendet. In 1 µL-Schritten wurden je 5 µL Probe, etwa 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt, auf die DC-Platte aufgebracht. Anschließend wurde die beladene DC-Platte in die mit Lösungsmittel gesättigte Kammer gestellt. Die DC wurde, nach Erreichen der Laufmittelfront etwa 1 cm unterhalb der oberen Plattenkante, beendet und das Lösungsmittel im Abzug vollständig entfernt. Die Substanzen wurden mittels Iod-Dampf und einer Betrachtung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 29: Messparameter der AFM-Messungen.

Parameter	Abbildung									
	18 A	18 B	18 C, 19	18 D	20	21, A	21, B	22	31 A	31 C
Auflösung [px]	256 x256	256 x256	512 x 512	256 x256	512 x 512	1024 x 1024	256 x 256	256 x 256	512 x 512	256 x 256
Peak force Amplitude [nm]	30	30	30	30	100	40	60	60	30	60
Peak Force Tapping Freq [kHz]	4	4	4	4	2	2	4	2	4	4
Scan Rate [Hz]	2	1	1,5	1,2	1,5	6,3	10	1	1,5	2,9
ScanAsyst Auto Control	Individual	Individual	Individual	Individual	On	Individual	Individual	Individual	Individual	Individual
ScanAsyst Auto Gain	On	On	On	On	On	On	On	On	On	On
ScanAsyst Auto Scan Rate	Off	Off	Off	On	On	Off	Off	Off	Off	Off
ScanAsyst Auto Setpoint	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off
ScanAsyst Auto Z Limit	On	On	On	On	On	Off	On	Off	On	On
ScanAsyst Gain Threshold	100	100	100	100	100	500	500	500	100	500
ScanAsyst Max. Setpoint	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ScanAsyst Min. Setpoint	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
ScanAsyst Noise Threshold	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,4
Manual Setpoint [pN]	50-200									
Deflection Sensitivity [nm/V]	19,5	11,3	19,5	16,8	16,8	22,7	18,8	22,7	19,8	18,8

## **3.7 Zellbiologische Methoden**

### **3.7.1 Kultivierungsbedingungen**

Eukaryotischen Zellen wurden in 3 cm oder 10 cm Gewebekulturschalen, unter sterilen Bedingungen, in 3 mL, bzw. 10 mL *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium kultiviert. Die eukaryotischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Oberflächen und Geräte wurden mit 80 % (v/v) Ethanol desinfiziert. Die Hitzesterilisation der verwendeten Glasgeräte erfolgte für 15 h bei 150 °C im Trockenschrank. Hitzestabile Lösungen (H<sub>2</sub>O, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS)) wurden für 20 min, bei 120 °C und bei 2 bar autoklaviert.

### **3.7.2 Passagieren von eukaryotischen Zellen**

Zellen werden passagiert, um eine Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen. Sobald ein konfluenter Zellrasen gewachsen war, wurde das Medium von den Zellen abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit 2 mL PBS (Tabelle 1) gewaschen und wurde mittels Pasteurpipetten abgesaugt. 2 mL einer Trypsin/EDTA-Lösung wurden auf die Zellen gegeben und diese solange darin inkubiert, bis die Zellen sich von der Kulturschale lösten. Die Zellen wurden in 8 mL Komplettmedium resuspendiert und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. 10 mL Komplettmedium wurden in eine Gewebekulturschale vorgelegt und die Zellen für die weitere Kultivierung im Verhältnis 1:8 bis 1:16 darin ausgesät.

### **3.7.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, werden diese transfiziert. Durch eine Komplexbildung der DNA mit Liposomen kann die DNA in die Zelle gelangen. Wird die Fremd-DNA in das Genom der Zelle eingebaut, so spricht man von einer stabilen Transfektion. Um den Einbau der Fremd-DNA zu fördern, enthält diese ein Resistenzgen, welches der Zelle einen Selektionsvorteil bringt, wenn das entsprechende Antibiotikum zugegeben wird.

Zur Transfektion von Zellen wurden diese in einer 3 cm-Kulturschale bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Zunächst wurden 10 µL Lipofectamine® 2000 mit 150 µL OptiMEM® in einem Reaktionsgefäß durch Invertieren gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 3 µg Plasmid-DNA ebenfalls mit 150 µL OptiMEM durch Invertieren gemischt. Diese beiden Ansätze wurden zusammengeführt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Wechsel des Zellmediums wurden 250 µL der DNA-Lipofectamin®-Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben.

Nach 24stündiger Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen passagiert (siehe Kap. 3.7.2). Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen nach weiteren 48 h unter Selektionsdruck (1 mg/mL Geneticin G418 im Komplettmedium) kultiviert.

### **3.7.4 Kultivierung auf Deckgläschen und Fixierung von eukaryotischen Zellen**

Um Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu betrachten, wurden diese auf einem Deckgläschen kultiviert und je nach Bedarf fixiert.

Zunächst wurde ein steriles Deckgläschen in eine 3 cm Gewebskulturschale gegeben. Dieses wurde mit 1,5 mL Poly-D-Lysin-Lösung (50 µg/mL) für drei Stunden inkubiert. Poly-D-Lysin verbessert die Adhäsion der Zellen an die Glas-/Kunststoffoberfläche des Deckgläschens, bzw. der Gewebskulturschale. Das Poly-D-Lysin wurde entfernt und überschüssiges Poly-D-Lysin wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde Komplettmedium vorgelegt, die Zellen ausgesät und kultiviert (siehe Kap. 3.7.1).

War das Deckgläschen konfluent mit Zellen bewachsen, wurde das Komplettmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (Tabelle 1) gewaschen. Um die Zellen zu fixieren, folgte eine 15 minütige Inkubation mit Paraformaldehyd (4 %) beim Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 50 µL Mowiol blasenfrei auf einen Objektträger gegeben. Das Deckgläschen wurde kurz in Wasser getaucht, um PBS-Reste zu entfernen und das überschüssige Wasser wurde an einem Kleenex-Tuch abgestreift. Das Deckgläschen wurde mit den Zellen nach unten blasenfrei auf den Mowiol-Tropfen gelegt und bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

## **3.8 Fluoreszenzmikroskopie**

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf einem Deckgläschen kultiviert (siehe Kap. 3.7.4) und bei Bedarf mit Mowiol fixiert. Sie wurden unter dem Mikroskop Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena) analysiert und aufgenommen

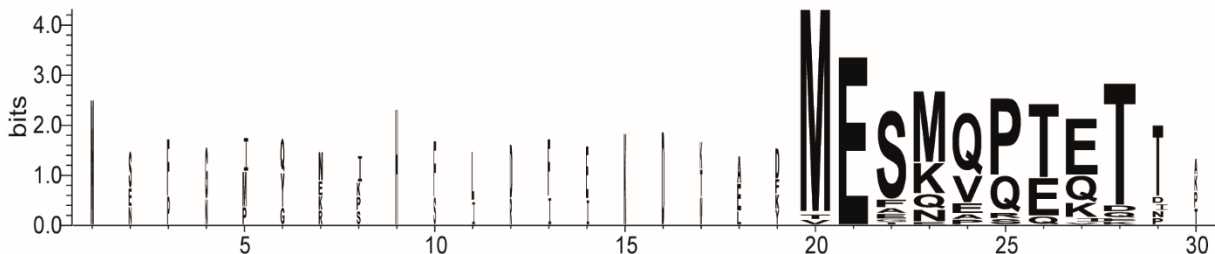
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 *Slr0483* – ein CurT-ähnliches Protein

CURT1 aus *Arabidopsis* ist ein integrales Membranprotein der Thylakoidmembran. Es induziert eine Membrankrümmung an den Rändern der Grana-Stapel von Chloroplasten [58]. Die CURT1-Proteinfamilie ist sowohl in den Chloroplasten von Pflanzen, als auch in der Thylakoidmembran von Cyanobakterien vertreten [55]. In *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Folgenden *Synechocystis*) codiert der Genlocus *slr0483* ein solches Protein (im Folgenden CurT). Dieses Protein soll als Modellprotein für CurT-ähnliche Proteine genauer betrachtet werden.

#### 4.1.1 In Cyanobakterien ist die kurze Genvariante des *slr0483* konserviert

Im Genlocus *slr0483*, der ein CurT-ähnliches Protein codiert, gibt es zwei mögliche Startpunkte für die Transkription. Um die Variante zu identifizieren welche weiter verbreitet ist, wurde zunächst ein Sequenzvergleich des von *slr0483* codierten Proteins, in seiner langen Variante, mit homologen Proteinen aus 50 Cyanobakterienstämmen durchgeführt (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Aminosäurevergleich der ersten 30 Aminosäuren der Proteinsequenz des *slr0483* Proteins aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, mit 50 homologen Proteinen aus Cyanobakterien.

Im Sequenzvergleich ist eine hohe Konservierung des Methionin 20 und der nachfolgenden Aminosäuren zu erkennen, während für die ersten 19 Aminosäuren nur eine geringe Konservierung festgestellt werden kann. Nur drei der 50 homologen Proteine liegen in der langen Variante (ca. 155 Aminosäuren) vor, während die restlichen 47 Proteine die kurze Variante (ca. 135 Aminosäuren) aufweisen, welche mit dem Methionin 20 startet. Daher wurde im Folgenden mit der Kurzvariante des *slr0483* Proteins (im Folgenden als CurT bezeichnet) gearbeitet.

### **4.1.2 Heterologe Expression in *E. coli* und Proteinreinigung**

Zur Analyse der Struktur und Funktion von Proteinen, wird das zu untersuchende Protein in ausreichender Menge und Reinheit benötigt. Hierzu wurde zunächst der passende *E. coli*-Stamm für eine heterologe Proteinexpression gesucht. Dazu wurde die Gensequenz von CurT in den pET303CTHis-Vektor kloniert und besitzt somit einen C-terminalen His-Tag.

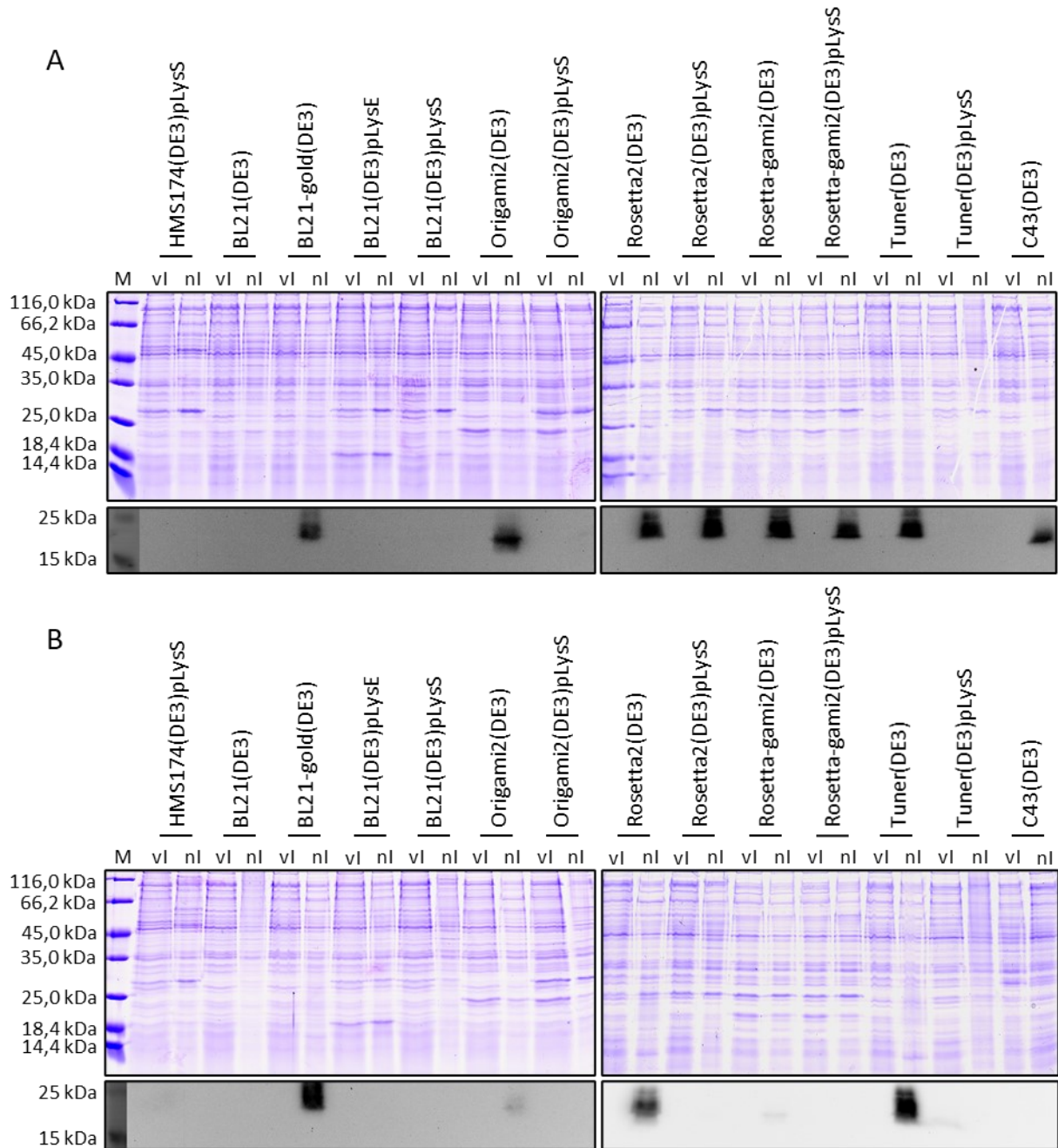
#### **4.1.2.1 CurT kann in diversen *E. coli*-Stämmen heterolog exprimiert werden**

Um den idealen *E. coli*-Stamm für eine heterologe Expression von CurT aus *Synechocystis* (16,5 kDa) zu finden wurde eine Expression im kleinen Maßstab (20 mL), in verschiedenen *E. coli*-Stämmen durchgeführt. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse dieser Expressionen ist in Abbildung 18 dargestellt.

In Abbildung 18 A ist die Analyse der Expressionen für 3 h bei 37 °C dargestellt. Eine Expression von CurT konnte in den Stämmen BL21-gold(DE3), Origami2(DE3), Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3) und C43(DE3) detektiert werden. Dabei war die stärkste Expression in Rosetta-gami2(DE3) und Rosetta2(DE3)pLysS zu beobachten. Die Stämme BL21-gold(DE3), Origami2(DE3) und C43(DE3) exprimierten dagegen weniger Protein. In allen anderen Stämmen war unter diesen Bedingungen keine Expression von CurT zu beobachten.

Bei der Expression von CurT über Nacht bei 20 °C (Abbildung 18 B) war zu beobachten, dass CurT generell schwächer exprimiert wurde. Bei den Stämmen BL21-gold(DE3) und Tuner(DE3) konnte dennoch eine starke Expression von CurT nachgewiesen werden. Im Stamm Rosetta2(DE3) wurde CurT nur sehr schwach exprimiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für eine Expression im großen Maßstab (2 L Kulturen) die *E. coli*-Stämme C43(DE3), Rosetta2(DE3) und Rosetta-gami2(DE3) verwendet. Die Expression erfolgte für 3 h bei 37 °C. Dabei konnte festgestellt werden, dass in Rosetta-gami2(DE3) die Expression von CurT am erfolgreichsten war (siehe Abbildung 77 Anhang). Aufgrund dessen wurde CurT im Folgenden in Rosetta-gami2(DE3) für 3 h bei 37 °C exprimiert.



**Abbildung 18: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von CurT.**

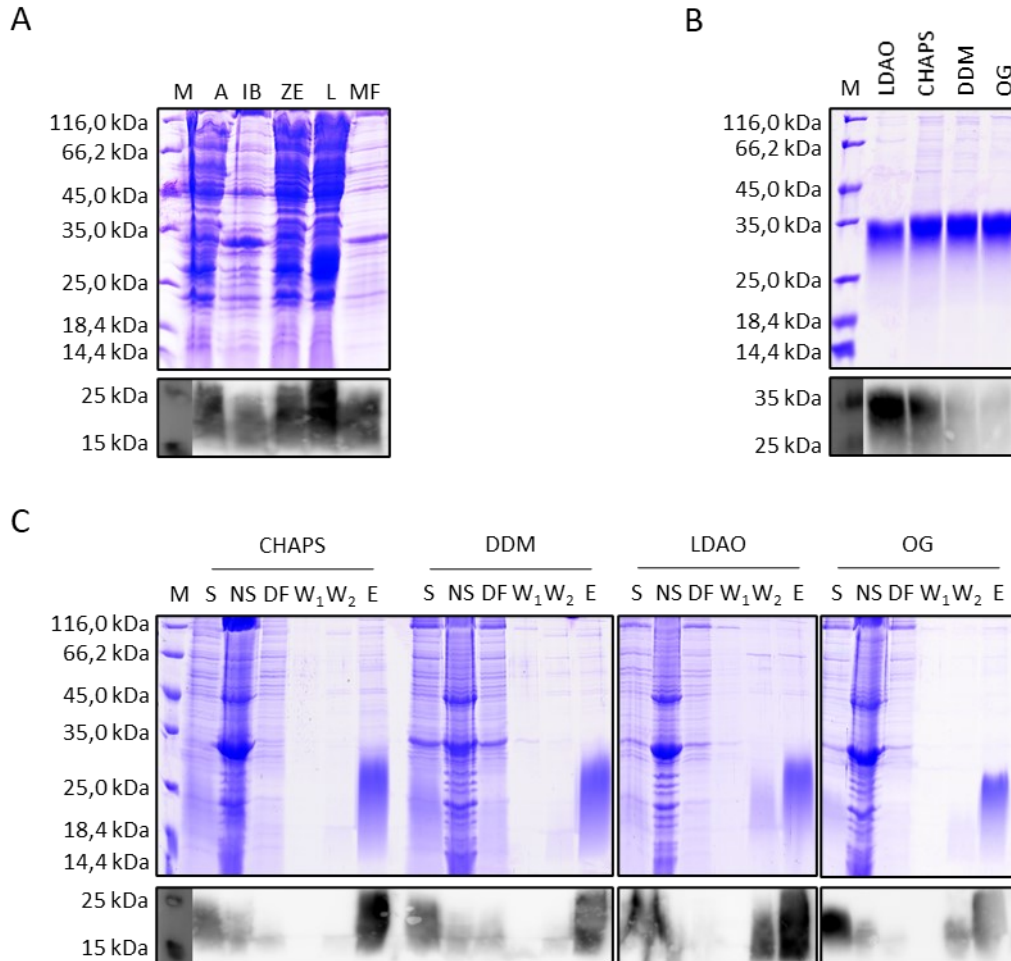
Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 14 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), Tuner(DE3)pLysS und C43(DE3). Die CurT-Bande kann bei ca. 16,5 kDa detektiert werden. Eine Expression von CurT bei 37 °C konnte in den Stämmen BL21-gold(DE3), Origami2(DE3), Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3) und C43(DE3) nachgewiesen werden. Bei einer Expression von CurT bei 20 °C konnte eine Expression von CurT in den Stämmen BL21-gold(DE3), Rosetta2(DE3) und Tuner(DE3) beobachtet werden. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion von CurT mittels anti-His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µl einer Probe mit OD<sub>600</sub> = 0,5. Als Marker (M) wurden 5 µl Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen. (A) Expression von CurT nach Induktion mit IPTG für 3 h bei 37 °C. (B) Expression von CurT nach Induktion mit IPTG über Nacht bei 20 °C.

#### 4.1.2.2 CurT kann mit LDAO aus der *E. coli*-Membran solubilisiert werden

Nach der erfolgreichen Expression von CurT in *E. coli* wurde es im nächsten Schritt aus der Membran herausgelöst, um es von Lipiden und anderen Membranproteinen abzutrennen. Hierzu wurde die Membran in verschiedenen Detergenzien aufgenommen und anschließend mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelate chromatography*, IMAC) im kleinen Maßstab gereinigt. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse des Aufschlusses der Bakterien ist in Abbildung 19 A dargestellt. In Spur A wurde eine Probe des Aufschlusses der Zellen mittels Ultraschall aufgetragen. Im Western Blot konnte CurT in der Probe des Aufschlusses detektiert werden. Es folgt die Spur IB, in der Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossene Zellen aufgetragen wurden. Bei einem idealen Zellaufschluss sollte in dieser Spur kein CurT enthalten sein. Leider konnte nach dem Aufschluss mittels Ultraschall CurT in Spur IB detektiert werden, womit dieses CurT nicht mehr für die weitere Reinigung verfügbar war. In Spur ZE wurde das Zellextrakt aufgetragen, welches durch Zentrifugation von Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossenen Zellen abgetrennt wurde. Dabei befindet sich das Zellextrakt im Überstand, während Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossene Zellen das Pellet bilden. In Spur ZE konnte mehr CurT detektiert werden als in Spur IB. Das Zellextrakt wurde mittels Ultrazentrifugation in die Lösliche- (Spur L) und die Membranfraktion (Spur MF) aufgetrennt. Dabei wurde die Membranfraktion pelletiert, während die lösliche Fraktion im Überstand verblieb. Ein großer Anteil des enthaltenen CurT entfiel dabei entgegen der Erwartung auf die lösliche Fraktion, obwohl es sich bei CurT um ein Membranprotein handelt. Das in der löslichen Fraktion detektierte CurT hatte die erwartete Größe von 16,5 kDa, wie auch das in der Membranfraktion detektierte CurT. Es konnten mittels SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse keine Unterschiede des CurT aus der löslichen und der Membranfraktion festgestellt werden. Da jedoch das Membranprotein CurT untersucht werden sollte, wurde mit dem CurT aus der Membranfraktion weitergearbeitet und die lösliche Fraktion verworfen.

Um CurT aus dem Membranpellet herauszulösen, wurde dieses in unterschiedlichen Detergenzpuffern aufgenommen (P-Puffer (Tabelle 1) mit 4 % CHAPS, 2 % DDM, 4 % LDAO oder 4 % OG). Die in Detergenzpuffer resuspendierte Membranfraktion wurde anschließend für eine Stunde invertiert. Anschließend wurde eine erneute Ultrazentrifugation durchgeführt, um nicht solubilisierte Membran abzutrennen. Mit der solubilierten Fraktion wurde eine Proteinreinigung mittels IMAC durchgeführt. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse ist in Abbildung 19 C dargestellt. In Spur S wurde jeweils das solubilisierte Protein aufgetragen, während in Spur NS das nicht solubilisierte Protein aufgetragen wurde. In Gegenwart der Detergenzien 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) und n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (OG) wurde der Großteil des Proteins solubilisiert. Bei Verwendung von Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO)

konnte diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da die Spuren im Blot nicht auswertbar sind. Die Solubilisate wurden im Anschluss für 1 h mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Dabei konnte bei keinem der Detergenzien eine vollständige Bindung von CurT beobachtet werden.



**Abbildung 19: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilisierung von CurT mit verschiedenen Detergenzien.**

Auf ein 14 %iges SDS-Gel, wurden in (A) 70 µg Gesamtprotein der Proben aus dem Aufschluss, (B) 12,5 µL der Proben der Eluate zum Mengenvergleich und (C) je 12,5 µL der Solubilisierung und Probereinigung mit unterschiedlichen Detergenzien aufgetragen. Vom Marker (M) wurden 5 µL aufgetragen. (A) Hier ist der Aufschluss der Bakterien aufgetragen. Spur A bezeichnet dabei den Aufschluss der Bakterien mittels Ultraschall, Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, Spur ZE zeigt das Zellextrakt, Spur L die lösliche Fraktion und Spur MF die Membranfraktion. CurT konnte in allen Fraktionen bei ca. 16,5 kDa nachgewiesen werden. (B) Der Mengenvergleich zeigte die maximale Bandenintensität der CurT-Bande (Detektion als Dimer bei 33 kDa) bei Verwendung von LDAO. (C) Hier sind die Solubilisierung und die Probereinigungen in den Detergenzien CHAPS, DDM, LDAO und OG aufgetragen. Dabei bezeichnet Spur S die solubilisierbare Membranfraktion, Spur NS die nicht solubilisierbaren Membranbestandteile, Spur DF den Durchfluss der Ni-NTA-Säule, Spur W<sub>1</sub> die Waschung mit 5 mM Imidazol, Spur W<sub>2</sub> die Waschung mit 50 mM Imidazol und Spur E die Elution von der Ni-NTA-Säule mit 500 mM Imidazol. Die CurT-Bande wurde bei 16,5 kDa detektiert. Unter Verwendung aller, der oben genannten Detergenzien war es möglich CurT mittels IMAC zu reinigen. Zum Vergleich der Eluate wurde eine weitere SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse durchgeführt (B). Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels anti-His-tag-Antikörper.

Ein großer Teil des Proteins konnte bei allen Versuchsansätzen im Säulendurchfluss (Spur DF) als nicht gebundenes Protein detektiert werden. Mit dem ersten Waschschrift (Spur W<sub>1</sub>, 5 mM Imidazol) wurde bei keinem Detergenz weiteres CurT von der Säule eluiert. Mit dem zweiten Waschschrift (Spur W<sub>2</sub>,

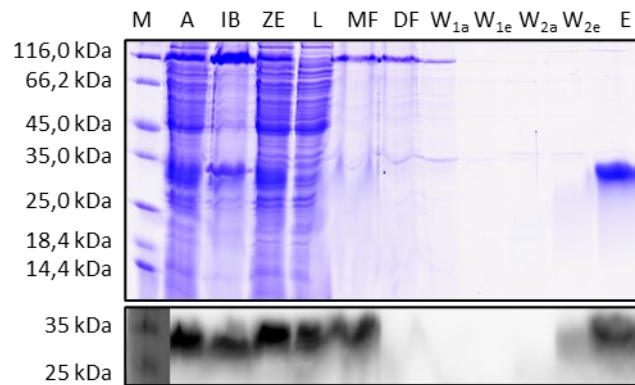
50 mM Imidazol) wurden bei der Verwendung von CHAPS und DDM nur geringe Mengen CurT von der Säule eluiert. Im Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit von OG und LDAO eine erhebliche Menge an CurT eluiert. In Spur E wurde die Elution mit 500 mM Imidazol aufgetragen. Es wurde bei allen Ansätzen CurT eluiert. Jedoch waren in Gegenwart von DDM und CHAPS noch sehr viele Verunreinigungen vorhanden. Bei Verwendung von LDAO und OG sind im Eluat weniger Verunreinigungen von CurT detektiert worden, jedoch scheint die Menge an eluiertem CurT in Anwesenheit von OG geringer.

Da bei keiner Reinigung ein signifikant besseres Ergebnis vorliegt, wurde eine SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Eluate durchgeführt (siehe Abbildung 19 B), um die maximale Ausbeute und den Reinheitsgrad zu vergleichen. Dabei wurde das meiste CurT im Western Blot des LDAO-Eluats detektiert. Da das LDAO-Eluat bereits einen recht hohen Reinheitsgrad aufweist, wird die Membran im Folgenden mit LDAO solubilisiert und die Reinigung weiter optimiert.

#### **4.1.2.3 CurT kann mit einer Ausbeute von 6,4 mg pro 2 L Expressionskultur erhalten werden**

Eine SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Proteinreinigung ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Spuren A bis MF stellen den Zellaufschluss mittels Microfluidizer und die anschließenden Zentrifugationsschritte zum Erhalten der Membranfraktion dar. Wie bereits in den vorherigen Versuchen war CurT auch weiterhin in Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossenen Zellen enthalten (Spur IB) und somit für die weitere Reinigung nicht zugänglich. Auch konnte weiterhin in der löslichen Fraktion (Spur L) CurT detektiert werden, welche für die weitere Reinigung nicht verwendet wurde. Im Durchfluss der Ni-NTA-Säule (Spur DF) fand sich dagegen kein CurT, was bedeutet, dass die gesamte Menge an CurT aus der Membranfraktion an das Säulenmaterial gebunden hat. Durch die Waschschrte wurde unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen, während CurT weiterhin gebunden blieb. Erst nach dem zweiten Waschschrte (Spur W<sub>2e</sub>) wurden geringe Mengen an CurT detektiert. CurT wurde anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert und konnte mit guter Ausbeute und hohem Reinheitsgrad erhalten werden (Spur E). Bei dieser Reinigung ist jedoch aufgefallen, dass die CurT-Bande nun bei höherem Molekulargewicht (ca. 33 kDa, bisher bei 16,5 kDa) in der SDS-PAGE und dem Western Blot detektiert wurde. Die nun detektierte Größe von etwas weniger als 35 kDa entspricht einem Dimer von CurT (2 x 16,5 kDa = 33 kDa). Diese Verschiebung des Molekulargewichtes kann ohne weitere Untersuchungen nicht geklärt werden.

Mit dem erarbeiteten Reinigungsprotokoll konnte CurT nun rein und mit einer Ausbeute von 3,2 mg/L Expressionskultur erhalten werden.



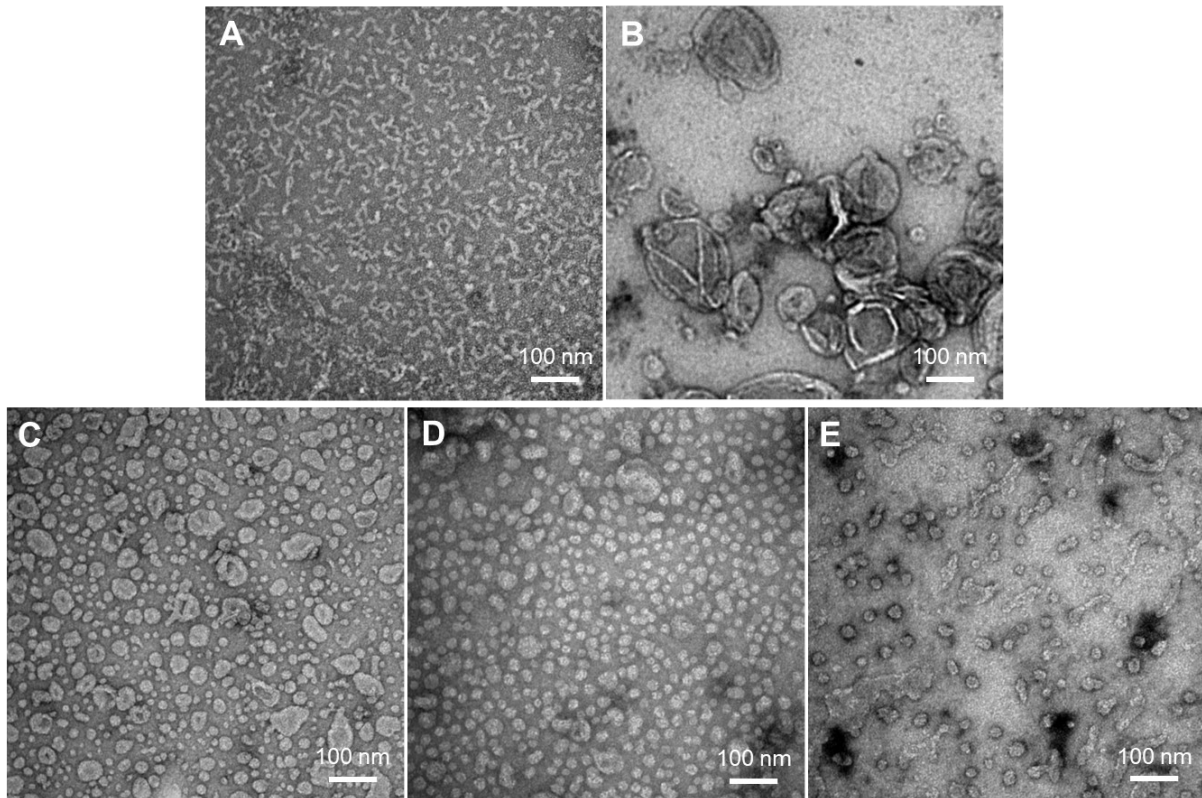
**Abbildung 20: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der CurT Reinigung mittels IMAC.**

Aufgetragen auf ein 14 %iges SDS-Gel, wurden je 12,5  $\mu$ L der Proben des Proteinaufschlusses und der Proteinreinigung mittels IMAC. Spur A bezeichnet dabei den Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer, Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, Spur ZE zeigt das Zellextrakt, Spur L die lösliche Fraktion und Spur MF die solubilisierte Membranfraktion. Die Spur DF bezeichnet den Durchfluss der Ni-NTA Agarose Säule. Nun folgen zwei Waschschritte, wobei jeweils eine Probe vom Anfang der Waschung <sub>a</sub> und vom Ende der Waschung <sub>e</sub> aufgetragen wurden. W<sub>1</sub> entspricht 5 mM Imidazol und W<sub>2</sub> 25 mM Imidazol. Anschließend wurde mit 500 mM Imidazol CurT von der Säule eluiert (Spur E). CurT wurde in dieser Analyse als Dimer von 33 kDa detektiert. In allen Proben des Aufschlusses (Spur A bis MF) konnte CurT beobachtet werden. Am Ende der zweiten Waschung (Spur W<sub>2e</sub>) werden geringe Mengen CurT eluiert. Durch die Elution mit 500 mM Imidazol konnte reines CurT erhalten werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels anti-His-tag-Antikörper.

### 4.1.3 CurT verändert die Form von Liposomen

Die Betrachtung von CurT-Proteoliposomen am Elektronen-Mikroskop (EM) wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Nadja Hellmann durchgeführt. Dazu wurde CurT in Dioleoylphosphatidylcholin/Dioleoylphosphatidylglycerin (DOPC/DOPG)-Liposomen rekonstituiert (Kapitel 3.3.15 Methodenteil). Als Kontrollen wurden sowohl CurT in DDM/Triton-X, als auch DOPC/DOPG-Liposomen betrachtet. In Abbildung 21 sind exemplarische EM-Aufnahmen von CurT (A), DOPC/DOPG-Liposomen (B) und Proteoliposomen mit unterschiedlichen CurT-Konzentrationen (C-E) abgebildet. Dabei konnten für CurT in Detergenz (DDM/Triton-X) größere Protein-Strukturen detektiert werden. Dabei handelt es sich vermutlich um CurT-Oligomere in Detergenz-Mizellen. Die DOPC/DOPG-Liposomen wiesen eine charakteristische Form mit einem Durchmesser von ca. 100 nm auf. Für die CurT-Proteoliposomen konnte eine Reduktion des Durchmessers der Liposomen auf ca. 20 nm beobachtet werden. Bei einem steigenden Protein zu Lipid Verhältnis konnten kleinere Durchmesser der Proteoliposomen beobachtet werden. Bei einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:85 konnten vereinzelt tubuläre Strukturen beobachtet werden.

Anhand der EM-Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass CurT einen Einfluss auf die Struktur von Liposomen hat.



**Abbildung 21: EM-Aufnahmen von CurT, DOPC/DOPG-Liposomen und Proteoliposomen.**

(A) EM-Aufnahme, des gereinigten CurT in Triton-X Mizellen. (B) DOPC/DOPG-Liposomen. (C-E) DOPC/DOPG-Proteoliposomen hergestellt bei einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:680 (C), 1:340 (D) und 1:85 (E). In Gegenwart von CurT ist die Struktur der Liposomen deutlich verändert. Die Präparation der Proteoliposomen erfolgte durch Prof. Dr. Nadja Hellmann, die EM-Bilder wurden von Dr. Frank Depoix aufgenommen. Die Proben wurden mittels *negativ stain* mit Uranylacetat sichtbar gemacht.

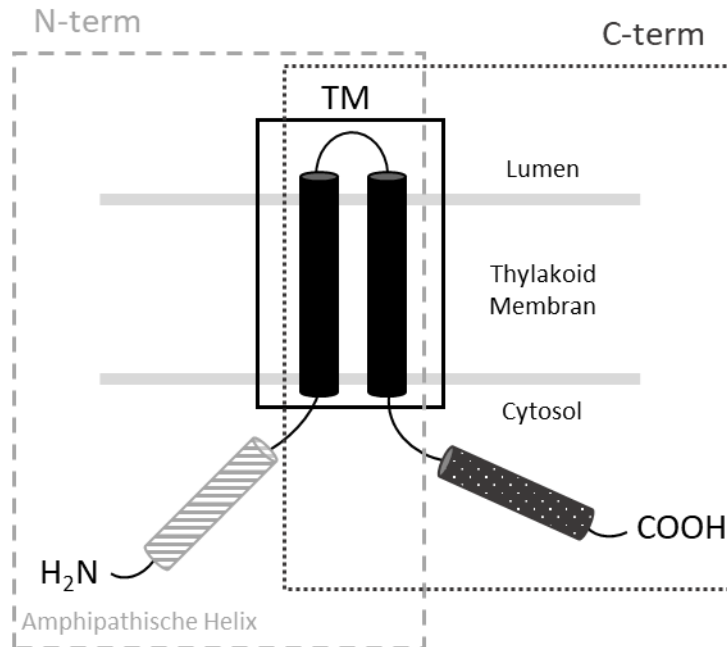
#### 4.1.4 Herstellung und Reinigung von CurT-Fragmenten

Das CurT-Protein besitzt zwei Transmembranhelices, sowie eine N-terminale amphipathische Helix und eine C-terminale  $\alpha$ -Helix (vgl. Schema Abbildung 22). Die amphipathische Helix soll bei der durch CurT induzierten Membrankrümmung involviert sein, während die C-terminale Helix ein *coiled-coil* zur Interaktion mit anderen Proteinen ausbilden soll [58].

Um die einzelnen Funktionen der Helices zu untersuchen, wurden drei Fragmente von CurT exprimiert und gereinigt. Hierzu wurde zunächst die Lokalisation der Transmembranhelices mittels des Programms TMHMM bestimmt [143]. Die Vorhersage ist in Abbildung 23 abgebildet. Demnach befindet sich die Transmembranhelix 1 zwischen Aminosäure 63 und Aminosäure 85, die Transmembranhelix 2 zwischen Aminosäure 90 und Aminosäure 112.

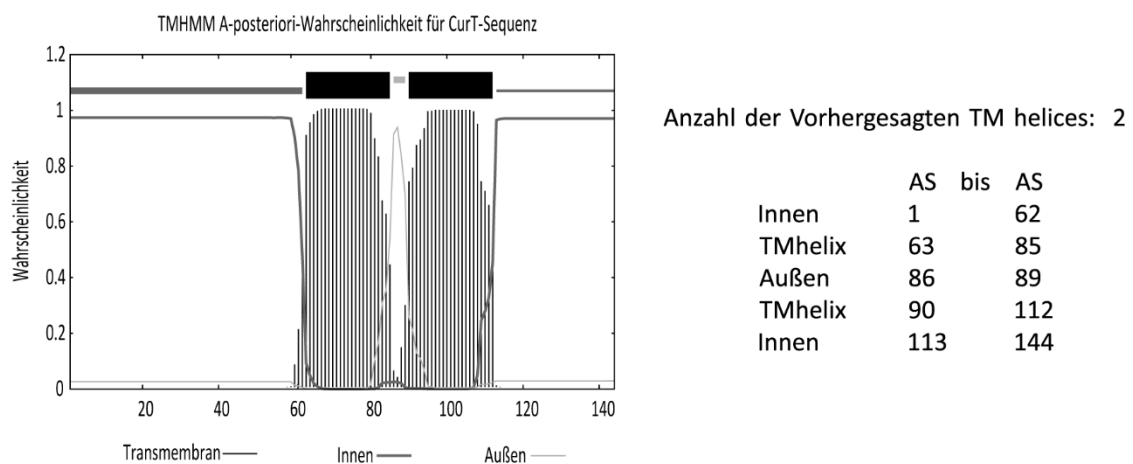
Aufgrund dieser Vorhersage wurden drei verschiedene Fragmente hergestellt: Das Transmembranfragment (TM, vgl. Abbildung 22) von Aminosäure 60 bis 115, das N-terminale Fragment (N-term, vgl. Abbildung 22) von Aminosäure eins bis Aminosäure 115, bestehend aus der

amphipathischen N-terminalen Helix und dem Transmembranbereich von CurT, und das C-terminale Fragment (C-term, vgl. Abbildung 22) von Aminosäure 60 bis Aminosäure 144, welches den Transmembranbereich und den C-terminalen Teil von CurT enthält. Alle drei Fragmente wurden in den pET303CTHis-Vektor kloniert und besitzen somit einen C-terminalen His-tag.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung CurT.**

Abgebildet ist eine schematische Darstellung von CurT. CurT besitzt eine N-terminale amphipathische Helix. Im Anschluss daran folgen die beiden Transmembranhelices. Am C-terminus befindet sich eine weitere  $\alpha$ -Helix die vermutlich für Interaktionen mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle spielt [58]. Beide Termini weisen Richtung Cytosol. Markiert wurden die drei zu untersuchenden Fragmente: TM bezeichnet dabei den Transmembranteil von CurT, N-Term das N-terminale Fragment und C-term das C-terminale Fragment.



**Abbildung 23: Vorhersage der Transmembranhelices von CurT anhand der Aminosäuresequenz mittels TMHMM-Server [143].**

Dargestellt ist links die A-posteriori-Wahrscheinlichkeit für die CurT Sequenz. Diese zeigt zwei Transmembranhelices an und lokalisiert beide Termini im Cytosol. Rechts ist die genaue Lokalisation der Transmembranhelices anhand der Aminosäure-Nummer dargestellt. AS bezeichnet hierbei die Nummer der Aminosäure im CurT, TM die Transmembranbereiche, Innen das Cytosol und Außen das Lumen.

#### **4.1.4.1 Die CurT-Fragmente können in *E. coli* heterolog exprimiert werden**

Es wurde eine Testexpression der Fragmente analog zur Expression des CurT wt durchgeführt (siehe Kap. 4.1.2.1), um die idealen Expressionsbedingungen zu identifizieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression des TM-Fragmentes im Gegensatz zu den anderen beiden Fragmenten ausschließlich in Rosetta-gami2(DE3) bei 20 °C über Nacht möglich war (siehe Abbildung 78 Anhang). Die Expression des 8 kDa großen Fragmentes erfolgte zudem nur in geringem Maß. Eine Expression im großen Maßstab erfolgte demnach in Rosetta-gami2(DE3) bei 20 °C.

Das 14 kDa große N-term-Fragment konnte dagegen in diversen *E. coli*-Stämmen exprimiert werden, sowohl bei 20 °C als auch bei 37 °C (siehe Abbildung 79 Anhang). Eine Expression im großen Maßstab erfolgte in Clear Coli® BL21(DE3) für 3 h bei 37 °C.

Das C-term-Fragment besitzt eine Größe von knapp 10 kDa und konnte bei den Expressionsbedingungen 3 h und 37 °C in fast allen getesteten *E. coli*-Stämmen exprimiert werden (siehe Abbildung 80 Anhang). Allerdings unterschied sich das Expressionsniveau zwischen den Stämmen. Auch über Nacht konnte eine Expression des C-term-Fragmentes beobachtet werden. Im großen Maßstab erfolgte die Expression in Tuner(DE3)pLysS für 3 h bei 37 °C. Zu erwähnen ist, dass bei einer Expression im großen Maßstab sowohl Monomer (10 kDa) als auch Dimer (20 kDa) detektiert werden konnten (siehe Abbildung 81 Anhang).

#### **4.1.4.2 Die Reinigung der CurT-Fragmente mittels IMAC muss weiter optimiert werden**

Nach erfolgreicher Expression aller CurT-Fragmente folgte im nächsten Schritt die Reinigung mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelate chromatography*, IMAC). Zunächst sollte analysiert werden, ob eine Reinigung der Fragmente nach dem Protokoll der CurT Wildtyp (wt) Reinigung (siehe Kap. 3.3.1, 4.1.2.3) möglich ist. Die Proteine wurden gereinigt und eine SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse durchgeführt. Diese Analyse ist in Abbildung 24 für alle drei Fragmente dargestellt.

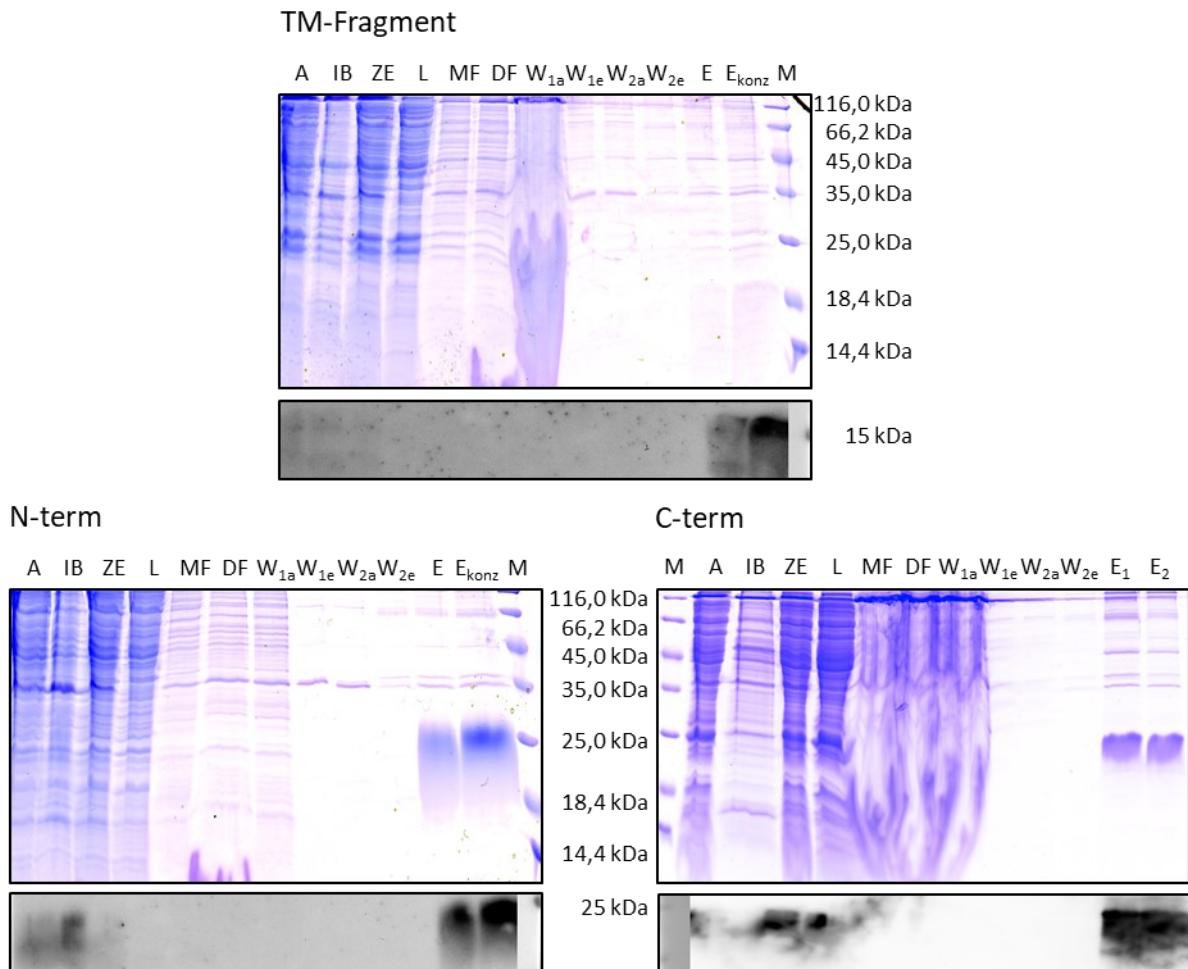
Bei der Reinigung des TM-Fragmentes fällt auf, dass das TM-Fragment mit Dimergröße (etwa 16 kDa) detektiert werden konnte. Des Weiteren konnten nur geringe Mengen an Protein in den ersten Schritten des Aufschlusses detektiert werden. So ist eine leichte Bande im Western Blot nach dem Aufschluss mittels Microfluidizer (Spur A) zu sehen. Wie beim Wildtyp auch kann eine geringe Menge Protein in den nicht aufgeschlossenen Zellen und Einschlusskörperchen detektiert werden (Spur IB). Jedoch ist auch im Zellextrakt (Spur ZE) das TM-Fragment enthalten. In den folgenden Spuren konnte das TM-Fragment nicht mehr detektiert werden. Da keine Detektion des TM-Fragmentes zu

beobachtet ist, waren nur sehr geringe Mengen an TM-Fragment in der Membranfraktion (Spur MF) enthalten. Des Weiteren konnte keine Elution des TM-Fragmentes von der Säule während der Waschschriffe beobachtet werden. Im Eluat konnte das TM-Fragment deutlich detektiert werden, jedoch kann in der SDS-PAGE-Analyse erkannt werden, dass noch eine große Verunreinigung durch andere Proteine vorlag. Auch das aufkonzentrierte Eluat (Spur E<sub>konz</sub>) bestätigte dies. Für eine vollständige Reinigung des TM-Fragmentes sind folglich noch Optimierungen nötig.

Bei der Reinigung des N-term-Fragmentes konnte eine Verschiebung des Molekulargewichts hin zu 25 kDa beobachtet werden. Erwartet wurde ein Molekulargewicht von 14 kDa. Wie bei der wt Reinigung und der Reinigung des TM-Fragmentes konnte auch bei der Reinigung des N-term-Fragmentes nur in den Spuren A, IB und ZE das Protein detektiert werden. Das N-term-Fragment konnte in nicht aufgeschlossenen Zellen und Einschlusskörperchen detektiert werden (Spur IB). Es tritt ebenfalls das Problem auf, dass kein N-term-Fragment in der Membranfraktion detektiert werden konnte. Im Eluat konnte das N-term-Fragment in größeren Mengen detektiert werden als das TM-Fragment. Jedoch konnten im Eluat weitere Proteine detektiert werden. Dies bestätigte auch das aufkonzentrierte Eluat (Spur E<sub>konz</sub>). Es waren jedoch deutlich weniger Verunreinigungen als bei dem TM-Fragment vorhanden. Trotzdem ist eine weitere Optimierung der Reinigung nötig, um reines N-term-Fragment zu erhalten.

Bei der Reinigung des C-term-Fragmentes wurde dieses bei einem Molekulargewicht von etwas unter 25 kDa detektiert. Dabei handelt es sich entweder um ein Dimer des C-term-Fragmentes (20 kDa) oder um eine Verschiebung des Molekulargewichtes. Die Analyse der Reinigung des C-term-Fragmentes ergibt, dass hier kaum Protein in den nicht aufgeschlossenen Zellen und Einschlusskörperchen (Spur IB) verloren ging. Dafür konnte jedoch einiges an Protein in der löslichen Fraktion (Spur L) detektiert werden. Zur Membranfraktion (Spur MF) kann aufgrund der Qualität des Western Blots keine Aussage getroffen werden. Da jedoch das C-term-Fragment eluiert werden konnte, muss es zumindest in geringen Mengen in der verwendeten Membranfraktion enthalten gewesen sein. In den Waschschriffen ging kein C-term-Fragment verloren. Das eluierte Protein war auch in diesem Fall noch durch weitere Proteine verunreinigt. Somit ist auch hier eine weitere Optimierung der Reinigung nötig.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Fragmente von CurT über eine IMAC gereinigt werden können, jedoch ist eine weitere Optimierung zur Verbesserung der Ausbeute und Reinheit notwendig.



**Abbildung 24: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Reinigungen der CurT-Fragmente nach wt-Protokoll.**

Aufgetragen auf ein 18 %iges SDS-Gel, wurden in den Spuren A bis MF je 50 µg Gesamtprotein und in den darauffolgenden Spuren das gleiche Volumen wie die Spur MF, der Proben des Proteinaufschlusses und der Proteinreinigung mittels IMAC. Spur A bezeichnet dabei den Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer, Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, Spur ZE zeigt das Zellextrakt, Spur L die lösliche Fraktion und Spur MF die solubilisierte Membranfraktion. Die Spur DF bezeichnet den Durchfluss der Ni-NTA-Agarose-Säule. Nun folgen zwei Waschschritte, wobei jeweils eine Probe vom Anfang der Waschung<sub>a</sub> und vom Ende der Waschung<sub>e</sub> aufgetragen wurden. W<sub>1</sub> entspricht 5 mM Imidazol und W<sub>2</sub> 25 mM Imidazol. Anschließend wurde mit 500 mM Imidazol CurT von der Säule eluiert (Spur E) E<sub>konz</sub> bezeichnet das aufkonzentrierte und ungepufferte Eluat. (TM-Fragment) Abbildung der Analyse der Reinigung des TM-Fragmentes von CurT. Das TM-Fragment wurde in der SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse bei etwa 16 kDa detektiert. Dies entspricht einem Dimer. In den Spuren des Aufschlusses (Spur A bis MF) konnte kaum TM-Fragment detektiert werden. Eine deutliche Detektion des TM-Fragments erfolgte nur im Eluat (Spur E) und dessen Konzentrat (Spur E<sub>konz</sub>). (N-term) Abbildung der Analyse der Reinigung des N-term-Fragmentes. Das N-term-Fragment wurde in der SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse bei etwa 25 kDa detektiert. Dabei handelt es um eine Verschiebung im SDS-Gel hin zu einem höheren Molekulargewicht. Das N-term-Fragment besitzt eine Größe von 14 kDa. In den Spuren des Aufschlusses (Spur A bis MF) konnte kaum TM-Fragment detektiert werden. Eine deutliche Detektion des N-term-Fragmentes erfolgte nur im Eluat (Spur E) und dessen Konzentrat (Spur E<sub>konz</sub>). (C-term) Abbildung der Analyse der Reinigung des C-term-Fragmentes, E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> bezeichnen dabei die ersten beiden Eluate a 2 mL. Das C-term-Fragment wurde in der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse bei etwas unter 25 kDa detektiert. Dabei handelt es sich entweder um ein Dimer (etwa 20 kDa) oder um eine Verschiebung hin zu höherem Molekulargewicht. In den Spuren des Aufschlusses (Spur A bis MF) konnte in den Fraktionen A, ZE und L C-term-Fragment detektiert werden. Eine deutliche Detektion des C-term-Fragmentes erfolgte in den beiden Eluaten (Spur E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub>). Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels anti-His-tag-Antikörper.

#### 4.1.5 Diskussion

Das integrale Membranprotein CurT aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Folgenden *Synechocystis*) induziert Membrankrümmung [55, 56]. Dabei ist eine höhere Dichte von CurT-Proteinen an Stellen, an denen die Thylakoidmembran zur Plasmamembran hin konvergiert zu finden [55, 56]. CurT wird dabei durch den Genlokus *slr0483* codiert. Durch Sequenzvergleich von homologen CurT-ähnlichen Proteinen in Cyanobakterien konnte das Startcodon für CurT identifiziert werden, welches die kürzere Variante im Genlokus *slr0483* codiert (Abbildung 17). Aufgrund dieser Erkenntnis wurde im Folgenden mit der kurzen Variante des *slr0483* codierenden CurT-Proteins gearbeitet. Bisherige Untersuchungen befassten sich dabei hauptsächlich mit *in vivo* Betrachtungen der CURT1-Proteinfamilie in Chloroplasten [55], bzw. Cyanobakterien [56]. Dabei wurde für eine *knock out* Mutante von CurT in *Synechocystis* eine deutliche Veränderung der Morphologie der Thylakoidmembran beobachtet (Abbildung 5) [56]. Des Weiteren konnte CurT sowohl aus *Arabidopsis thaliana* (im Folgenden *Arabidopsis*) als auch aus *Synechocystis* mittels zellfreier Systeme hergestellt werden und der Einfluss auf Liposomen untersucht werden [55, 56]. Dabei konnten für beide Proteine eine Verformung der Liposomen und das Auftreten von tubulären Strukturen beobachtet werden [55, 56]. Zellfreie Expressionssysteme haben sowohl Vorteile als auch Nachteile. Vorteile sind die einfache Modifikation des Systems, die geringere Anfälligkeit gegenüber toxischen Proteinen und der Einsatz des Systems für Hochdurchsatzscreenings [164]. Nachteile sind hingegen die langwierige Entwicklung eines passenden Systems, beträchtliche Kosten während der Entwicklung und der Materialien und der meist kleine Maßstab [165, 166]. Eine kostengünstige und zeitsparende Alternative ist die heterologe Expression in *E. coli*. Dabei können große Mengen an heterolog exprimiertem Protein hergestellt werden, welche anschließend über immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelate chromatography*, IMAC) gereinigt werden können. Dies ermöglicht Untersuchungen, z.B. der Struktur und Funktion des isolierten Proteins. Dazu wurden zusätzlich zum wildtypischen CurT Fragmente des Proteins exprimiert und gereinigt.

##### 4.1.5.1 Die Expression und Reinigung von CurT und seinen Fragmenten konnte erfolgreich durchgeführt werden

Die heterologe Expression von Proteinen aus der CurT-Proteinfamilie in *E. coli* ist in der Literatur kaum beschrieben [167]. In dieser Arbeit konnte erstmals die heterologe Expression von CurT aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 in *E. coli* erfolgreich durchgeführt werden (siehe Abbildung 18). Auch Fragmente des Proteins, welchen die C-/N-terminale Helix fehlten bzw. nur der Transmembranbereich (TM-Fragment), konnten exprimiert werden (siehe Anhang Abbildung 78, Abbildung 79, Abbildung 80). Dabei wurde festgestellt, dass nicht alle Konstrukte ein gleiches Expressionsverhalten

aufweisen. Während das wildtypische CurT und die C- und N-terminalen Fragmente in diversen *E. coli*-Stämmen exprimiert wurden, so konnte das TM-Fragment nur in geringen Mengen in Rosetta-gami2(DE3) exprimiert werden. Behrendorff *et al.* konnten ebenfalls eine schlechte Expression eines fluoreszenzmarkierten CurT TM-Fragments beobachten [167]. Diese vermuteten, dass die schlechte Expression durch den stark hydrophoben Charakter des TM-Fragments hervorgerufen wird. Dieser hydrophobe Charakter könnte für das Bakterium ein Signal zum Abbau des Proteins darstellen. Sollte dies der Fall sein, dann wäre auch durch die Veränderung der Expressionsbedingungen keine verbesserte Expression des CurT TM-Fragments zu erwarten. Jedoch könnte untersucht werden, ob durch Zugabe von Glucose oder Veränderung der IPTG-Konzentration eine verbesserte Expression des TM-Fragment zu erreichen ist [168, 169].

Bei der Reinigung des wildtypischen CurT mittels IMAC konnte eine Ausbeute von 6,4 mg pro 2 L Expressionskultur erhalten werden. Dabei konnten in der SDS-PAGE-Analyse keine Verunreinigungen detektiert werden. Diese Reinigung ermöglichte demnach die weitere Analyse der Struktur und Funktion von CurT, unabhängig von anderen Proteinen oder Lipiden. Die Funktion von CurT sollte dabei über den Einfluss von CurT auf Proteoliposomen untersucht werden (siehe unten). Die Reinigungen der untersuchten Fragmente von CurT (TM-, N-term und C-term Fragment) nach wildtyp-Protokoll führte zu unterschiedlichen Reinheitsgraden. Jedoch konnte für kein Fragment derselbe Reinheitsgrad wie für den Wildtyp erhalten werden. Aufgrund der schlechten Expression ist die Ausbeute des TM-Fragments klein. Dabei weist die Fraktion des gereinigten TM-Fragments Verunreinigungen durch höhermolekulare Proteine auf (siehe Abbildung 24). Eine Möglichkeit zur Optimierung der Reinigung des TM-Fragments ist die Anpassung der Waschschrirte. Da jeweils am Ende der Waschfraktionen (Spur  $W_{1e}$  und  $W_{2e}$ ) noch unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen wurde, sollte das Volumen dieser Waschschrirte erhöht werden, um alle unspezifisch gebundenen Proteine abzuwaschen. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob eine Erhöhung der Imidazol-Konzentration möglich ist ohne TM-Fragment von der Säule zu eluieren. Dabei könnten weitere unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen werden. Führen diese Optimierungen nicht zu reinem TM-Fragment könnte im Anschluss an die IMAC eine Größenausschlusschromatographie erfolgen, um höhermolekulare Proteinverunreinigungen vom TM-Fragment abzutrennen. Dieselben Optimierungsschrirte sollten bei der Reinigung des N-terminalen und C-terminalen Fragments durchgeführt werden, da diese ebenfalls nicht nach wildtyp-Protokoll vollständig gereinigt werden konnten. Es wurden ebenfalls höhermolekulare Proteinverunreinigungen detektiert (siehe Abbildung 24).

Des Weiteren konnte bei der Expression des C-term-Fragmentes festgestellt werden, dass zusätzlich zur Monomerbande eine Dimerbande detektiert werden konnte (siehe Abbildung 81). Da denaturierender Probenpuffer mit SDS für die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse verwendet wurde,

scheint die Interaktion zwischen den CurT-Fragmenten sehr stark zu sein. Dies stärkt die These, dass die C-terminale  $\alpha$ -Helix für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist [58].

In dieser Arbeit konnte CurT aus einer heterologen Expression in *E. coli* mit anschließender Proteinreinigung über IMAC gewonnen werden. Die Expression eines N-terminalen und C-terminalen Fragments von CurT konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Reinigung der Fragmente bedarf weiterer Optimierungen. Dahingegen konnte für das TM-Fragment festgestellt werden, dass Expression und Reinigung noch zu optimieren sind.

#### **4.1.5.2 CurT kann mit membrankrümmenden Eigenschaften aus *E. coli* gewonnen werden**

In Kooperation mit Prof. Dr. Nadja Hellmann konnte CurT in Dioleoylphosphatidylcholin/Dioleoylphosphatidylglycerin (DOPC/DOPG)-Liposomen rekonstituiert werden. Dies ermöglichte die Untersuchung des Einflusses von CurT auf die Struktur von Liposomen mittels Elektronenmikroskopie (EM) (siehe Abbildung 21). Dabei wurde festgestellt, dass die Größe der Liposomen mit steigendem Protein:Lipid Verhältnis in den Proteoliposomen abnahm, und somit die Krümmung der Lipidoberfläche zunahm. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass funktionsfähiges CurT bei der heterologen Expression und anschließender Proteinreinigung aus *E. coli* erhalten werden konnte. In Gegenwart von CurT bilden sich demnach, aufgrund der membrankrümmenden Eigenschaften [55, 56, 58], kleinere Liposomen aus als ohne Protein. Des Weiteren konnten bei einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:85 vereinzelt tubuläre Strukturen beobachtet werden. Diese sind ein weiteres Indiz für die membrankrümmenden Eigenschaften von CurT und konnten sowohl für CurT aus *Arabidopsis* als auch für CurT aus *Synechocystis* nachgewiesen werden [55, 56]. Dabei wurden von Heinz *et al.* und Armbruster *et al.* Verknüpfungen von größeren Liposomen durch tubuläre Strukturen beobachtet [55, 56]. Im Gegensatz hierzu wurden in dieser Arbeit hauptsächlich kleine Liposomen und vereinzelt tubuläre Strukturen, die im Durchmesser den Liposomen entsprechen beobachtet. Eine Ursache für diese Unterschiede könnte die Lipidzusammensetzung der verwendeten Liposomen sein. So wurden in der Literatur die Lipide der Thylakoid-Membran [12] in leicht verändertem Verhältnis (25 % Monogalactosyldiacylglycerol, 42 % Digalactosyldiacylglycerol, 16 % Sulfon-quinovosyldiacylglycerol, 17 % Phosphatidylglycerol) verwendet. Dieses Lipidgemisch unterscheidet sich in der Gesamtladung nicht von dem hier verwendeten Gemisch aus DOPC (70 %) und DOPG (30 %). Jedoch sind die Lipide der Thylakoidmembran hauptsächlich Galaktolipide. Das Vorhandensein dieser Zuckerkopfgruppen könnte zu einem Unterschied in der beobachteten Morphologie der Liposomen führen, bzw. als Interaktionspartner von CurT könnte die Art der Lipide einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben.

Durch die Rekonstitution der Fragmente von CurT in Liposomen, könnte die Domäne von CurT identifiziert werden, welche für die Krümmung der Membran verantwortlich ist. Im Allgemeinen wird vermutet, dass die N-terminale amphipathische Helix die Membrankrümmung induziert [55, 56, 170, 171]. Somit wird eine Krümmung der Membran lediglich für das N-terminale Fragment erwartet. Diese Versuche konnten im Zuge dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

## **4.2 Tetraspanin-8**

Tetraspanin-8 ist ein humanes Protein der Tetraspanin Superfamilie. Tetraspanin-8 ist ein integrales Membranprotein mit einer Größe von 27 kDa. Es liegt in Tetraspanin-angereicherten Domänen in der Membran vor. In diesen Domänen interagiert es mit diversen anderen Proteinen. Da Tetraspanin-8 in diversen Krebsarten eine Rolle spielt [68], soll die Struktur und Funktion genauer untersucht werden.

### **4.2.1 Heterologe Expression in *E. coli* und Proteinreinigung**

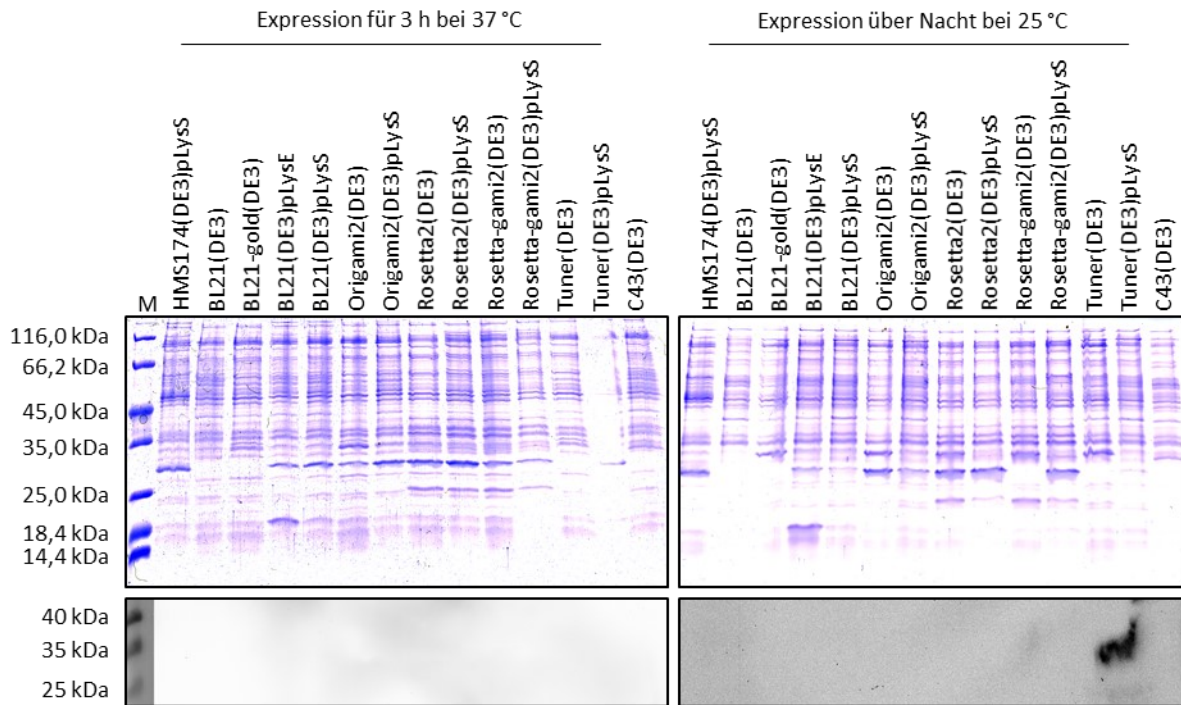
#### **4.2.1.1 Tetraspanin-8 kann im *E. coli*-Stamm Tuner(DE3)pLysS heterolog exprimiert werden**

Um die Struktur und Funktion von Tetraspanin-8 *in vitro* zu untersuchen werden große Mengen an gereinigtem Protein benötigt. Hierfür soll Tetraspanin-8 heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Bisher ist kein Protokoll zur heterologen Expression und anschließender Proteinreinigung aus *E. coli* etabliert. Zunächst wurde dementsprechend nach den besten Bedingungen und dem optimalen *E. coli*-Stamm gesucht, um humanes Tetraspanin-8 (mit His-Tag ca. 29 kDa) heterolog zu exprimieren. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression (Durchführung siehe Kap. 3.2.3) ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Testexpression wurde bei zwei unterschiedlichen Bedingungen (3 h bei 37 °C, bzw. über Nacht bei 25 °C) durchgeführt.

Bei einer Expression von Tetraspanin-8 für drei Stunden bei 37 °C konnte bei keinem der untersuchten *E. coli*-Stämme Tetraspanin-8 detektiert werden. Unter diesen Bedingungen ist eine Expression von Tetraspanin-8 demnach nicht möglich.

Werden die Bedingungen dahingehend geändert, dass die Expression über Nacht bei 25 °C durchgeführt wurde, so konnte in Tuner(DE3)pLysS Tetraspanin-8 detektiert werden. Alle anderen *E. coli*-Stämme exprimierten auch unter diesen Bedingungen kein Tetraspanin-8.

Tetraspanin-8 wurde im Folgenden im großen Maßstab (2 L) in Tuner(DE3)pLysS exprimiert.



**Abbildung 25: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von Tetraspanin-8.**

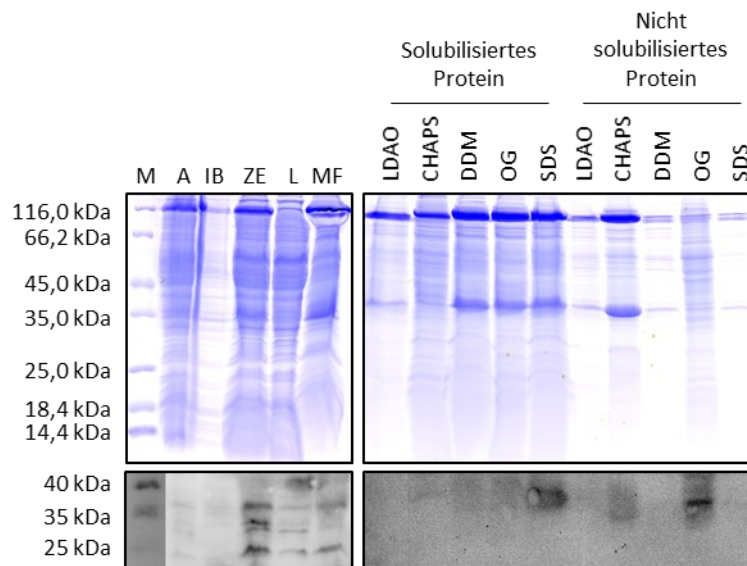
Proben des Gesamtzellextraktes nach der Induktion mit IPTG und erfolgter Expression (3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 25 °C) wurden in einem 14 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), Tuner(DE3)pLysS und C43(DE3). Die Tetraspanin-8 besitzt eine Größe von 29 kDa. Nur im *E. coli*-Stamm Tuner(DE3)pLysS konnte eine Expression von Tetraspanin-8 detektiert werden. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion von Tetraspanin-8 mit anti-His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µL einer Probe mit OD<sub>600</sub> = 0,5. Vom Marker (M) wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen.

#### 4.2.1.2 Tetraspanin-8 kann mit DDM aus der *E. coli*-Membran solubilisiert werden

Nachdem Tetraspanin-8 erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden konnte sollte es im nächsten Schritt aus der Membran isoliert werden.

In Abbildung 26 ist die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilisationsfähigkeit unterschiedlicher Detergenzien abgebildet. In Spuren A bis MF wurden die Proben des Aufschlusses aufgetragen. Es folgen die Spuren von solubilierten Proteinen und Proteinen welche nach der Detergenzbehandlung weiterhin in der Membran verblieben sind. In Spur A wurden die Zellfragmente nach dem Aufbrechen mittels Ultraschall aufgetragen. Hier wurde kaum Tetraspanin-8 detektiert (keine Bande bei 29 kDa). In Spur IB wurden die Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*) und nicht aufgeschlossenen Zellen aufgetragen, welche durch Zentrifugation vom Zellextrakt getrennt wurden. Auch in Spur IB konnte kaum Tetraspanin detektiert werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass das vorhandene Tetraspanin im Zellextrakt vorliegt. Dieses wurde in Spur ZE aufgetragen. Hier konnte im Western Blot eine deutliche Bande detektiert werden, die der Masse des

Tetraspanin-8 entspricht. In Spur L wurde die lösliche Proteinfraktion nach Ultrazentrifugation aufgetragen. Auch hier konnte Tetraspanin-8 detektiert werden, obwohl es als Membranprotein nicht in dieser Fraktion vorliegen sollte. Jedoch hat auch die Membranfraktion (Spur MF) das erwartete Tetraspanin beinhaltet. Um dieses Tetraspanin zugänglich zu machen wurde das Membranpellet in unterschiedlichen detergentenhaltigen Puffern (Puffer B (Tabelle 1) mit 4 % LDAO, 4 % CHAPS, 2 % DDM, 4 % OG oder 6 % SDS) solubilisiert.



**Abbildung 26: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilisierungsfähigkeit verschiedener Detergenzien.**

Aufgetragen, auf ein 14 %iges SDS-Gel, wurden je 12,5 µL der Proben aus dem Aufschluss und der anschließenden Solubilisierung der Membran mit unterschiedlichen Detergenzien. Vom Marker (M) wurden 5 µL aufgetragen. Es folgt der Aufschluss mittels Ultraschall (A), die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossenen Zellen (IB), das Zellextrakt (ZE), die lösliche Fraktion (L) und die Membranfraktion (MF). Anschließend ist das solubilierte Protein in den unterschiedlichen Detergenzien (LDAO, CHAPS, DDM, OG, SDS) aufgetragen, gefolgt von dem nicht solubilierten Protein in den unterschiedlichen Detergenzien. Die Tetraspanin-8 Bande wird bei 29 kDa erwartet. Tetraspanin-8 konnte in den Proben ZE, L und MF nachgewiesen werden. Tetraspanin-8 wurde in geringen Mengen unter Verwendung von DDM und OG solubilisiert. Die Verwendung von SDS diente als Positivkontrolle und solubilierte alle Proteine der Membranfraktion. In Gegenwart von CHAPS und OG konnte Tetraspanin-8 in der nicht solubilierten Fraktion beobachtet werden. Bei Verwendung von LDAO konnte Tetraspanin-8 in keiner Fraktion detektiert werden. Bei Verwendung von DDM konnte Tetraspanin-8 ohne Verluste solubilisiert werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels anti-His-tag-Antikörper.

In der rechten Hälfte von Abbildung 26 ist das Polyacrylamidgel der SDS-PAGE-Analyse, der solubilierten Proteine und der nicht solubilierten Proteine abgebildet. Dabei dient Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) als Positivkontrolle und sollte jegliche Proteine aus der Membran herauslösen, bzw. die Membran vollständig auflösen. Dies konnte in der SDS-PAGE-, sowie der Western Blot-Analyse deutlich gezeigt werden. Der Großteil der Proteine konnte bei Nutzung von SDS in die solubilierten Fraktion überführt werden, darunter auch Tetraspanin-8. Bei der Verwendung von Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) konnte weder in der solubilierten Fraktion noch in der nicht solubilierten Fraktion Protein detektiert werden. Auch in der Western Blot-Analyse konnte kein Tetraspanin detektiert werden, weswegen LDAO nicht zur Solubilisierung von

Tetraspanin-8 geeignet ist. Da Tetraspanin-8 in der Membranfraktion enthalten war, wurde die Detektion entweder durch die Gegenwart von LDAO gestört oder LDAO führte zu einer Aggregation von Tetraspanin-8 (Aggregate bleiben während der Elektrophorese in den Taschen des Polyacrylamidgels zurück). 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) und Octyl- $\beta$ -glucosid (OG) besitzen beide nicht die Eigenschaften Tetraspanin-8 zu solubilisieren. In der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse wurde ein Großteil des Tetraspanin-8 in der nicht solubilisierten Fraktion detektiert. Nur geringe Mengen des Tetraspanin-8 wurden in der solubilisierten Fraktion detektiert, weswegen auch diese beiden Detergenzien nicht geeignet erscheinen um Tetraspanin-8 zu solubilisieren. Nur n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) konnte ein ähnliches Solubilisierungsverhalten wie die Positivkontrolle (SDS) aufweisen. Es konnte nur in der solubilisierten Fraktion Tetraspanin-8 schwach detektiert werden, wenn auch in geringerem Ausmaß als in der SDS-Probe.

DDM konnte Tetraspanin-8 im Vergleich zu LDAO, CHAPS und OG am besten solubilisieren und wurde deswegen im Folgenden zur Solubilisation verwendet.

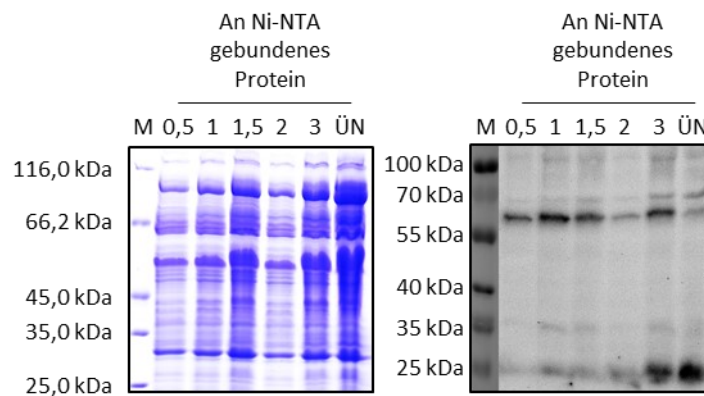
#### **4.2.1.3 Tetraspanin-8 kann abhängig von der Inkubationszeit als Dimer, bzw. Monomer an der Ni-NTA-Agarose detektiert werden**

Nach erfolgter Solubilisation der Membranproteine sollte Tetraspanin-8 über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelate chromatography*, IMAC) gereinigt werden. Der fusionierte His-Tag am Tetraspanin-8 ermöglicht eine Bindung an das Säulenmaterial, während andere Proteine nicht binden und vom Tetraspanin-8 getrennt werden können. Als Säulenmaterial wurde Ni-NTA-Agarose verwendet.

Die solubilisierten Membranproteinen wurden im nächsten Schritt mit Ni-NTA inkubiert. Um möglichst das komplette Tetraspanin-8 zu erhalten wurde die solubilierte Membranfraktion von 0,5 h bis über Nacht (ÜN) mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Proben der an die Ni-NTA Agarose gebundenen Proteine ist in Abbildung 27 dargestellt. Im Western Blot konnte bei geringen Inkubationszeiten ein Dimer von Tetraspanin-8 (etwa 58 kDa) beobachtet werden. Bei einer halben Stunde Inkubationszeit mit der Ni-NTA-Agarose wurde im Western Blot nur eine sehr schwache Monomerbande (ca. 29 kDa) detektiert. Erst bei längeren Inkubationszeiten (3 h und ÜN) wurde eine größere Menge Monomer an das Säulenmaterial gebunden. Es konnte festgestellt werden, dass bei längeren Inkubationszeiten die Intensität der Dimerbande abnimmt. Außerdem konnte bei der SDS-PAGE-Analyse erkannt werden, dass bei längeren Inkubationszeiten eine größere Anzahl an anderen Proteinen unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose gebunden wurde. Besonders bei einer Inkubation über Nacht wurden sehr viele Proteine an das Säulenmaterial gebunden. Zwischen einer halben Stunde

Inkubation und einer Stunde Inkubation konnte noch kein großer Unterschied in der unspezifischen Bindung beobachtet werden. Nach 1,5 h nahm die Zahl an unspezifisch gebundenen Proteinen bereits deutlich zu. Nach zwei Stunden schien es, als wären erneut weniger Proteine gebunden, jedoch ist auch die Bandenintensität im Western Blot deutlich geringer als zuvor. Deswegen konnte davon ausgegangen werden, dass die Probe in diesem Fall nach zwei Stunden im Verhältnis eine geringere Konzentration besitzt als die restlichen Proben. Darum scheint auch die unspezifische Bindung hier wieder abzunehmen. Dies ist vermutlich jedoch nicht der Fall.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde im Folgenden für eine Stunde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, da hier die höchste Tetraspanin-Bindung in Kombination mit der geringsten unspezifischen Proteinbindung vorliegt.



**Abbildung 27: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Proteinbindung an die Ni-NTA Agarose.**

Aufgetragen, auf ein 14 %iges SDS-Gel, wurden je 12,5  $\mu$ L der Proben, nach unterschiedlichen Zeitpunkten (Zahlen über Spur gibt Zeit der Inkubation in Stunden an, bzw. über Nacht (ÜN)), nach der Bindung von Protein an Ni-NTA Agarose. Dabei wurde nach der Inkubation mit Ni-NTA-Agarose die Agarose abzentrifugiert (5 min, 100 g, 4 °C). Die Agarose wurde in 1x Probenpuffer aufgenommen und auf das SDS-Gel aufgetragen. Das Tetraspanin-8 Monomer besitzt eine Größe von 29 kDa, ein Dimer besitzt eine berechnete Größe von etwa 58 kDa. Es konnte beobachtet werden, dass die Dimerbindung an die Ni-NTA-Agarose mit steigender Inkubationszeit abnimmt, während die Monomerbindung zunimmt. Im Folgenden wurde für eine Stunde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, da hier die höchste Tetraspanin-Bindung in Kombination mit der geringsten unspezifischen Proteinbindung vorliegt. Vom Marker (M) wurden 5  $\mu$ L aufgetragen. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

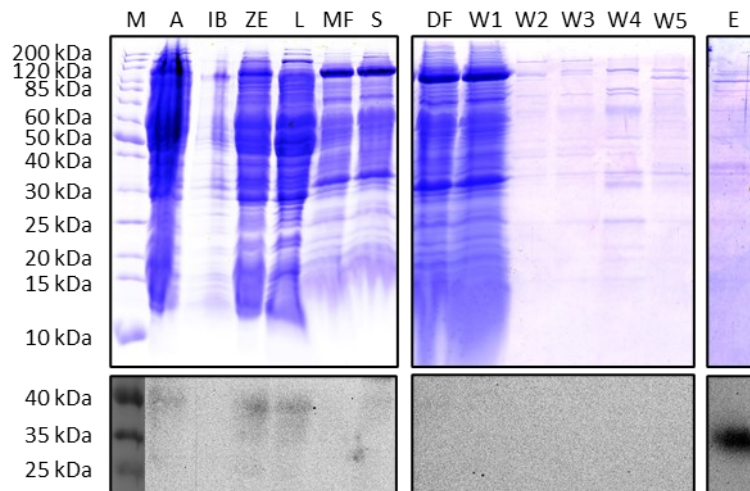
#### 4.2.1.4 Tetraspanin-8 kann in geringen Mengen mittels IMAC gereinigt werden

Anschließend an die Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose sollten im nächsten Schritt unspezifisch gebundenen Proteine vom Ni-NTA-Agarose-Säulenmaterial abgewaschen werden, sodass final reines Tetraspanin-8 eluiert werden kann.

In Abbildung 28 ist die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Reinigung von Tetraspanin-8 mit fünf Waschschritten abgebildet. Dabei wurde die Imidazol-Konzentration sukzessive erhöht, um Bindungen

an die Ni-NTA-Agarose mit Imidazol abzusättigen und so Proteine abzuwaschen, bzw. zu eluieren. In Spur A wurde die Fraktion nach dem Aufschluss mittels Ultraschall aufgetragen. Im Western Blot konnten hier geringe Menge an Tetraspanin-8 detektiert werden. Die Spur IB bezeichnet nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*). Da kein Tetraspanin-8 detektiert werden konnte war alles Tetraspanin-8 für die Reinigung in der zugänglichen Fraktion, dem Zellextrakt (Spur ZE) enthalten. Wie erwartet konnte in der Spur ZE Tetraspanin-8 im Western Blot detektiert werden. In Spur L wurden die löslichen Proteine nach einer Ultrazentrifugation aufgetragen, in Spur MF die Membranfraktion. Leider konnte ein Großteil des Tetraspanin-8 in der löslichen Fraktion detektiert werden und nur ein geringer Anteil in der Membranfraktion. Da jedoch das Membranprotein Tetraspanin-8 untersucht werden soll, wurde mit der Membranfraktion weitergearbeitet und die lösliche Fraktion verworfen. Dass Tetraspanin in der Membranfraktion vorhanden ist konnte anhand von Spur S, dem Solubilisat, festgestellt werden. Hier wurde in der Western Blot-Analyse nur eine sehr schwache Bande detektiert, die dem Tetraspanin-8 zugeordnet wurde. Der Durchfluss nach der Inkubation mit Ni-NTA Agarose wurde in der Spur DF aufgetragen. Diese Fraktion enthält alle Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden haben. Es wurde kein Tetraspanin-8 detektiert, was bedeutet, dass alles Tetraspanin an das Säulenmaterial gebunden hatte. Nun folgten die Waschschrte W1 bis W5. Gewaschen wurde mit steigender Imidazol-Konzentration. In Waschschrte 1 (W1, 5 mM Imidazol) konnte noch viel unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen werden. Auch mit den Puffern W2 (10 mM Imidazol), W3 (20 mM Imidazol), W4 (50 mM Imidazol) und W5 (100 mM Imidazol) konnte weiteres, unspezifisch gebundenes Protein vom Säulenmaterial gewaschen werden. Da im Western Blot keine Banden detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass kein Tetraspanin-8 mit diesen Imidazol-Konzentrationen von der Ni-NTA-Agarose gewaschen wurde. Bei Erhöhung der Imidazol-Konzentration auf 250 mM konnte Tetraspanin-8 eluiert werden (Spur E). Jedoch war die erhaltene Menge an Tetraspanin nicht besonders groß, da eine Detektion nur auf dem Western Blot möglich war und nicht mittels SDS-PAGE-Analyse. Zusätzlich kam es zu einer Verschiebung der detektierten Größe hin zu einem kleineren Molekulargewicht.

Aufgrund der geringen Ausbeute an Tetraspanin-8, kann keine eindeutige Aussage über den Reinheitsgrad des Proteins getroffen werden. Die erhaltene Menge Tetraspanin-8 ermöglicht es nicht weitere Analysen bezüglich der Struktur und Funktion durchzuführen. Zunächst muss mehr Protein in einer Reinigung erhalten werden können. Dies konnte im Laufe dieser Arbeit nicht etabliert werden.



**Abbildung 28: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der Reinigung von Tetraspanin-8.**

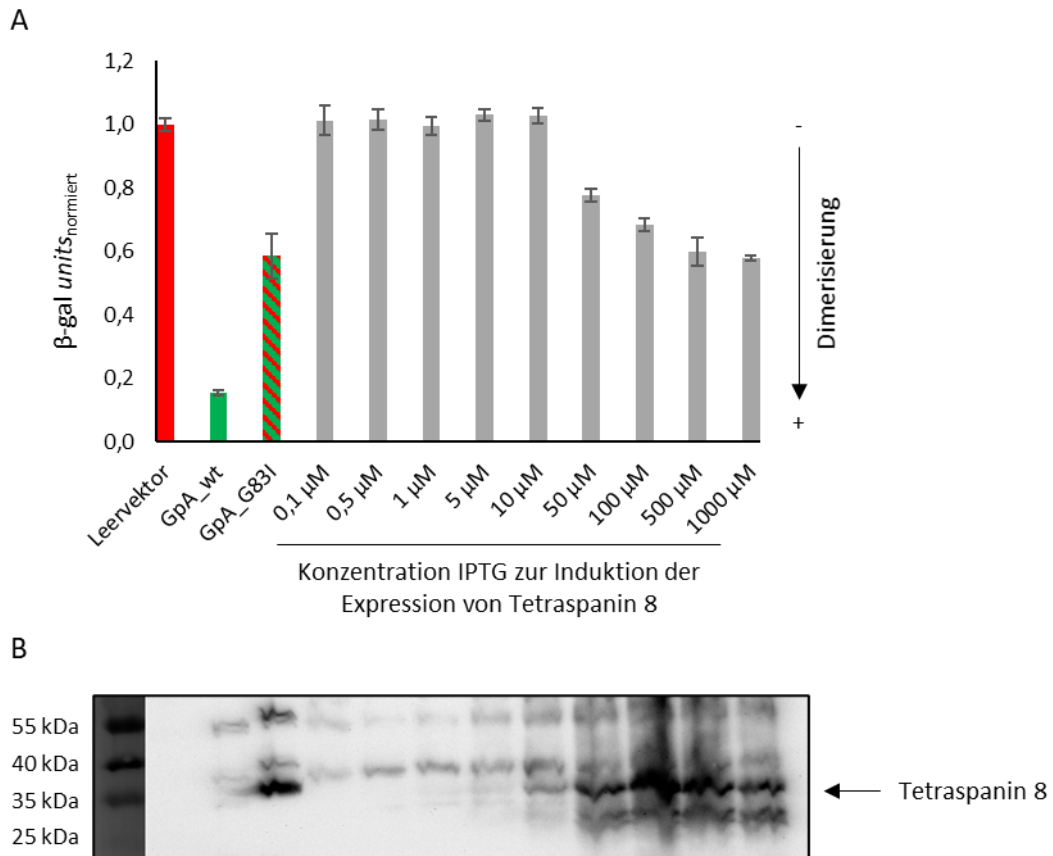
Aufgetragen auf ein 14 %iges SDS-Gel, wurden 50 µg Gesamtprotein aus dem Aufschluss und der anschließenden Reinigung von Tetraspanin-8. Vom Marker (M) wurden 5 µL aufgetragen. Es folgt der Aufschluss mittels Ultraschall (A), die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossenen Zellen (IB), das Zellextrakt (ZE), die lösliche Fraktion (L), die Membranfraktion (MF) und das Solubilisat (S). Von den folgenden Proben wurden stets dasselbe Volumen aufgetragen wie vom Solubilisat, um diese Spuren mit der Membranfraktion und dem Solubilisat vergleichen zu können. Es folgt der Säulendurchfluss (DF), die Waschstschritte W1 (5 mM Imidazol), W2 (10 mM Imidazol), W3 (20 mM Imidazol), W4 (50 mM Imidazol) und W5 (100 mM Imidazol). Zuletzt ist die Elution (E) mit einer Imidazol-Konzentration von 250 mM aufgetragen. Die Tetraspanin-8 Bande wird bei 29 kDa erwartet. Tetraspanin-8 konnte in den Proben A, ZE, L, S und E detektiert werden. Im Eluat (Spur E) konnte Tetraspanin-8 nur im Western Blot, nicht in der SDS-PAGE-Analyse detektiert werden. Eine Reinigung von Tetraspanin-8 ist mit geringer Ausbeute möglich. Es wurde der PageRuler™ Unstained Protein Ladder für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

## 4.2.2 Dimerisierung und Lokalisation von Tetraspanin-8 *in vivo*

### 4.2.2.1 Ab 10 µM IPTG nimmt die Dimerisierung von Tetraspanin-8 mit der IPTG-Konzentration zu

Tetraspanin-Proteine bilden Tetraspanin-angereicherte Domänen in der Membran. Dabei interagieren sie mit anderen Tetraspanin-Proteinen. Das GALLEX-System dient der Detektion von Oligomerisierungen [133] und wurde im Folgenden für den Nachweis der Oligomerisierung des Tetraspanin-8 verwendet (siehe auch Methodenkap. 3.3.14). Dazu wurde Tetraspanin-8 mit einer LexA-Bindedomäne N-terminal fusioniert. Die chimären Fusionsprodukte wurden im *E coli*-Stamm SU101 exprimiert. Anschließend wurden die β-gal *units* bestimmt, welche ein Maß für die Dimerisierung darstellen (Formel (3)). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pMalp2 in SU101 transformiert, dies führt zu keiner Expression von LexA und somit kann keine Dimerisierung detektiert werden. Als Positivkontrolle dient die LexA fusionierte Transmembranhelix des Glycophorin A (GpA). Eine Aminosäuremutation des Glycin 83 zu einem Isoleucin in dieser Transmembranhelix des GpA (GpA\_G83I) führt zu einem verminderten Dimerisierungsverhalten. Die besten Bedingungen für die Detektion der Dimerisierung wurden über die Modulation der Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Konzentration während der Expression der Tetraspanin-

Fusionskonstrukte untersucht. Die erhaltenen  $\beta$ -gal *units* sind in Abbildung 29 A dargestellt. Daraus geht hervor, dass ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M IPTG die Dimerisierung von Tetraspanin-8 zunimmt. Bei niedrigeren IPTG-Konzentrationen konnte keine Dimerisierung von Tetraspanin-8 detektiert werden. Bei einer Erhöhung der IPTG-Konzentration über 500  $\mu$ M IPTG konnte keine Zunahme der Dimerisierung mehr beobachtet werden. Trotzdem konnte für Tetraspanin-8 nur eine mittelmäßige Dimerisierung beobachtet werden, die in etwa mit der Dimerisierung der GpA-Mutante übereinstimmt.



**Abbildung 29: Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Dimerisierung von Tetraspanin- 8 im GALLEX-Experiment.**

Bei steigender IPTG-Konzentration wurde die Homodimerisierung und Expression von Tetraspanin-8 im GALLEX-System analysiert. (A) Normierten  $\beta$ -gal *units* der *in vivo* Homodimerisierung von Tetraspanin-8 in SU101-Zellen bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung). Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMalp2. Als Positivkontrolle diente die Transmembranhelix des Glycophorin A (GpA). Die Mutante von GpA\_G83I (Glycin 83 zu Isoleucin) zeigt ein vermindertes Dimerisierungsverhalten. Die Normierung erfolgt auf den Mittelwert der Negativkontrolle und wird auf 1,0 gesetzt. Ab 10  $\mu$ M IPTG kann eine Dimerisierung von Tetraspanin-8 detektiert werden, welche mit steigender IPTG-Konzentration zunimmt. (B) Western Blot-Analyse des SU101 NaOH-Extraktes zur Ermittlung des Expressionsniveaus. Dazu wurden Proben nach erfolgter Expression genommen, sodass eine  $OD_{600} = 1,0$  vorliegt. Die Bakterien wurden pelletiert und einer NaOH-Extraktion unterzogen. Von den Extrakten wurden 10  $\mu$ L auf ein SDS-Gel geladen und einer Western Blot-Analyse durchgeführt. GpA\_LexA besitzt eine Größe von etwa 26 kDa, Tetraspanin-8-LexA von etwa 35 kDa. Vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) wurden 5  $\mu$ L aufgetragen. Als Erstantikörper diente *LexA DNA Binding Region Antibody*, als Zweitantikörper wurde *Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase* verwendet.

Um einen Hinweis auf das Expressionsniveau zu erhalten, wurden von den Expressionskulturen Proben genommen und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Der Western Blot ist in Abbildung 29 B dargestellt. Neben diversen unspezifisch detektierten Banden ist hier zu erkennen, dass erst ab einer

IPTG-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine deutliche Expression von Tetraspanin-8 detektiert werden konnte. Unter dieser IPTG-Konzentration konnte kaum bis gar keine Expression von Tetraspanin-8 beobachtet werden. Bei 100  $\mu\text{M}$  IPTG konnte die höchste Expression von Tetraspanin-8 detektiert werden. Bei 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  konnte ebenfalls eine große Menge an Tetraspanin-8 detektiert werden. Diese Beobachtungen korrelieren mit den gemessenen  $\beta\text{-gal units}$ . Da eine Expression erst ab 50  $\mu\text{M}$  IPTG stattfindet, ist eine Dimerisierung erst ab dieser Konzentration messbar. Steigt die exprimierte Tetraspanin-Menge an, dann ist auch ein erhöhtes Dimerisierungsverhalten zu beobachten. Das maximale Dimerisierungsverhalten wurde ab 500  $\mu\text{M}$  IPTG detektiert. Über die maximale Expression von Tetraspanin-8 kann aufgrund der schlechten Qualität des Western Blots keine Aussage getroffen werden.

Im Folgenden wurden GALLEX-Experimente mit Tetraspanin-8 bei einer IPTG-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  durchgeführt, da hier eine deutliche Dimerisierung zu beobachten war.

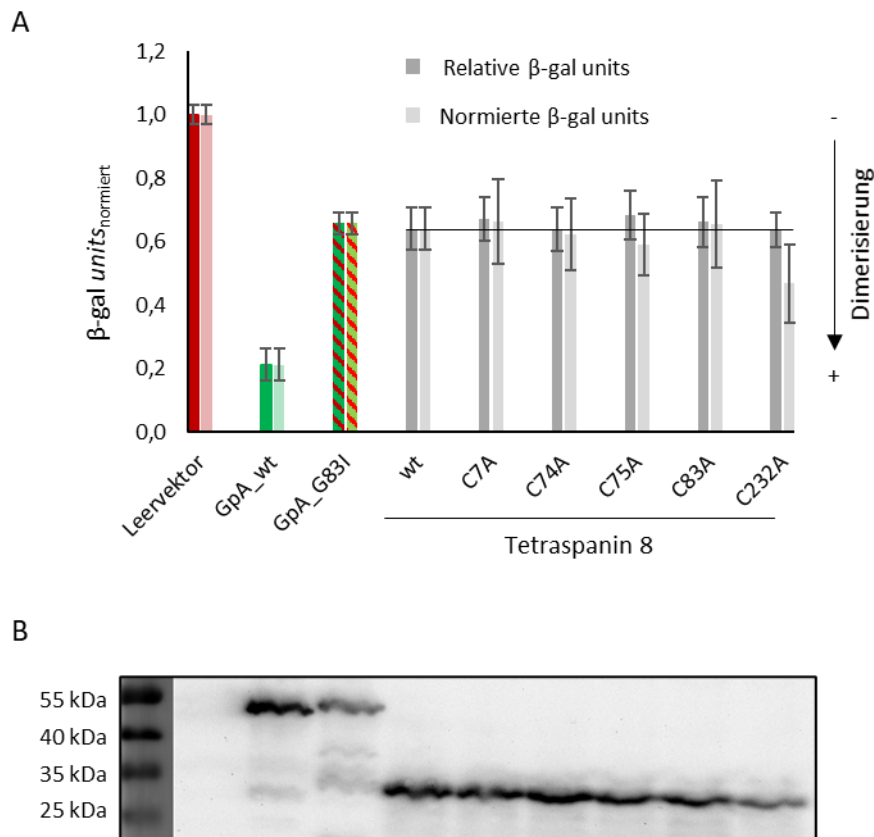
#### **4.2.2.2 Einzelmutationen von fünf Cystein-Seitenketten im Tetraspanin-8 führen nicht zu einer Veränderung der Dimerisierung**

Tetraspanin-8 besitzt fünf Cysteine, welche potenzielle Palmitoylierungs-Stellen darstellen [68]. Bei CD151, einem Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie, konnte eine Veränderung der Interaktionen mit anderen Tetraspanin-Proteinen und anderen Proteinen an der Zelloberfläche beobachtet werden, indem die Palmitoylierungs-Stellen entfernt wurden [172]. Die gleichen Beobachtungen wurden bei CD81 (auch Tetraspanin-28 genannt) gemacht [173]. Um zu überprüfen, ob die Entfernung der Palmitoylierungs-Stellen zu einer veränderten Dimerisierung des Tetraspanin-8 führt, wurden die analogen Cysteine zu Alanin mittels ortsspezifischer Mutagenese mutiert. Ein Ausschnitt aus dem Aminosäurevergleich von CD151, CD81 und Tetraspanin-8 ist in Abbildung 30 dargestellt. Die mutierten Cysteine sind fett hervorgehoben. Dabei fällt auf, dass die Cysteine 7 und 74 (Nummerierung bezogen auf Tetraspanin-8) konserviert sind. Cystein 75 ist nur in Tetraspanin-8 und CD151 vorhanden jedoch nicht in CD81. Cystein 83 ist in CD151 nicht vorhanden, jedoch in CD81 relevant, weswegen dieses Cystein auch mutiert wird. Die Cysteine 242 und 243 des CD151 sind nicht in Tetraspanin-8, bzw. CD81 konserviert. Aufgrund dessen wird Cystein 232 betrachtet, welches auch in CD81 vorliegt und sich laut Aminosäurenvergleich in räumlicher Nähe befindet. Zunächst sollten die Einfachmutanten betrachtet werden.

CD151	MGEFNEKKTTCGTV <b>CL</b> KYLLFT	VLG <b>CC</b> ATFKERRNLLRLYFI	IFT <b>CC</b> LYRSLKLE-HY
CD81	MGVEG-----CTK <b>C</b> IKYLLFV	FLG <b>CY</b> GAIQESQ <b>CL</b> LGTFFT	ILSMVL <b>CC</b> GIRNSSVY
Tetraspanin-8	MA--G-----VS <b>A</b> CIKYSMFT	FLG <b>CC</b> GAIKESR <b>C</b> MLLLFFT	VFSMVL <b>C</b> QIGN---K
	* . . : * : * * : *	. * * * . : : * : *	: : : * :
	1 . . . . . 10	75 . . . . . 85	230

**Abbildung 30: Ausschnitt aus dem Aminosäurevergleich von Tetraspanin-8 mit CD151 und CD81.**

Die mutierten Cysteine in CD151, CD81, bzw. Tetraspanin-8 sind fett dargestellt. Die Cysteine 7 und 74 bezogen auf Tetraspanin-8 sind konserviert. Zusätzlich wurde Cystein 83 welches in Tetraspanin-8 und CD81 vorliegt mutiert. Da die Cysteine 242 und 243 im CD151 keine Äquivalente im Tetraspanin-8 und CD81 haben, wurde das Cystein 232 mutiert, welches in räumlicher Nähe zu den Cystein-Resten aus CD151 liegt. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäurereste von Tetraspanin-8.



**Abbildung 31: Einfluss der Cystein-Mutationen auf die Dimerisierung von Tetraspanin-8.**

Betrachtet wurde die Homodimerisierung und Expression von Tetraspanin-8 im GALLEX-System. (A) Normierten  $\beta$ -gal units der *in vivo* Homodimerisierung von Tetraspanin-8 und den Cystein-Einfachmutanten in SU101-Zellen ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung). Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMalp2. Als Positivkontrolle diente die Transmembranhelix des Glycophorin A (GpA). Die Mutante von GpA\_G83I (Glycin 83 zu Isoleucin) zeigt ein vermindertes Dimerisierungsverhalten. Die Normierung erfolgt auf den Mittelwert der Negativkontrolle und wird auf 1,0 gesetzt (dunkelgrau). Die  $\beta$ -gal units der Tetraspanin-Proteine werden zusätzlich auf das Expressionsniveau des Wildtyps (wt) normiert (hellgrau). Die schwarze Linie dient zum besseren Vergleich mit dem Tetraspanin-8 Wildtyp und ist auf Höhe seiner  $\beta$ -gal units. Es konnten keine Unterschiede im Dimerisierungsverhalten beobachtet werden. (B) Western Blot-Analyse des SU101 DNase/Lysozym-Verdau zur Ermittlung des Expressionsniveaus. Dazu wurden Proben nach erfolgter Expression genommen, sodass eine  $OD_{600} = 1,0$  vorliegt. Die Bakterien wurden pelletiert und einem DNase/Lysozym-Verdau unterzogen. Von den verdauten Proben wurden 10  $\mu$ l auf ein SDS-Gel geladen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. GpA\_LexA besitzt eine Größe von etwa 26 kDa, Tetraspanin-8-LexA von etwa 35 kDa. Vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) wurden 5  $\mu$ l aufgetragen. Als Erstantikörper diente LexA DNA Binding Region Antibody, als Zweitantikörper wurde Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase verwendet.

Mittels des GALLEX-Systems wurde das Dimerisierungsverhalten der Cystein-Alanin-Mutanten im Vergleich zum wildtypischen Tetraspanin-8 betrachtet. Da in *E. coli* keine Palmitoylierungen erfolgen, wurde mit diesem Experiment geprüft, ob die Cystein-Seitenkette einen Einfluss auf das

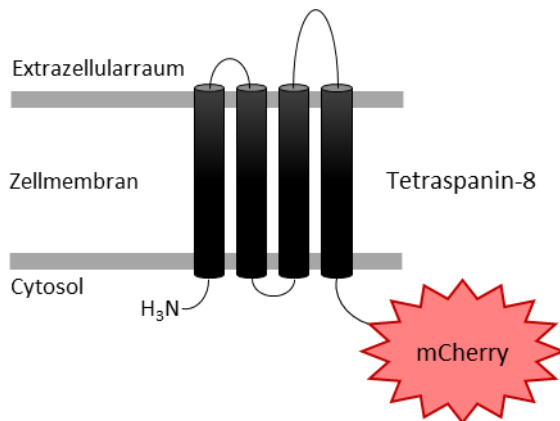
Dimerisierungsverhalten von Tetraspanin-8 hat. Hierzu wurden die LexA-Fusionsproteine in SU101-Zellen exprimiert bis einen  $OD_{600} = 0,6$  erreicht war. Die Expression wurde mit 500  $\mu\text{M}$  IPTG induziert. In Abbildung 31 A ist das Ergebnis des GALLEX-Experiments dargestellt. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMalp2, welcher bei der Normierung einen Wert von 1,0 erhält. Die Positivkontrolle GpA zeigt einen geringen Wert der  $\beta\text{-gal units}$ , was einem hohen Dimerisierungsgrad entspricht. Wie beim vorherigen Versuch war die Dimerisierung des Tetraspanin-8-Wildtyps vergleichbar mit dem Dimerisierungsverhalten der Mutante des GpA. Somit zeigt Tetraspanin-8 ein eher mäßiges Dimerisierungsverhalten. Die relativen  $\beta\text{-gal units}$  der Einzelmutanten zeigten keine Veränderung im Dimerisierungsverhalten bezogen auf den Wildtyp. Betrachtet man das Expressionsniveau (siehe Abbildung 31 B) so kann man erkennen, dass die Mutante C232A unter den gewählten Bedingungen eine geringere Expression aufwies als die Restlichen Mutanten, bzw. der Wildtyp. Die Analyse des Expressionsniveaus erfolgte über die Auswertung der Bandenintensität mit dem Programm *ImageJ* [128]. Das geringere Expressionsniveau führte zu einem verhältnismäßig höheren Dimerisierungsgrad als beim Wildtyp. Allerdings wurde der Fehler bei Einbeziehung des Expressionsniveaus für die Mutante C232A größer, was ein Hinweis auf eine unterschiedlich starke Expression gibt, da die relativen  $\beta\text{-gal units}$  einen recht kleinen Fehler aufweisen.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnten keine Unterschiede im Dimerisierungsverhalten der Cystein-Einzelmutanten gegenüber wildtypischen Tetraspanin-8 beobachtet werden. Für genauere Aussagen bezüglich des Dimerisierungsverhalten der Einzelmutanten sind weitere Untersuchungen notwendig.

#### **4.2.2.3 Einzelmutationen im Tetraspanin-8 führen zu einer geringfügig anderen Lokalisation in HEK293-Zellen**

Palmitoylierungen stellen zusätzliche Membranverankerungen dar. Durch die Entfernung der Palmitoylierungsstellen, sprich der entsprechenden Cysteine, kann sich also eine Veränderung in der Lokalisation von Tetraspanin-8 in der Zelle ergeben.

Um dies zu untersuchen, wurde mCherry, ein fluorophores Protein, C-terminal an Tetraspanin-8 und die Einzelmutanten fusioniert und in HEK293 transient transfiziert. Die Lokalisation des Proteins konnte anschließend über Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Eine schematische Darstellung des mCherry-Konstruktes ist in Abbildung 32 dargestellt.



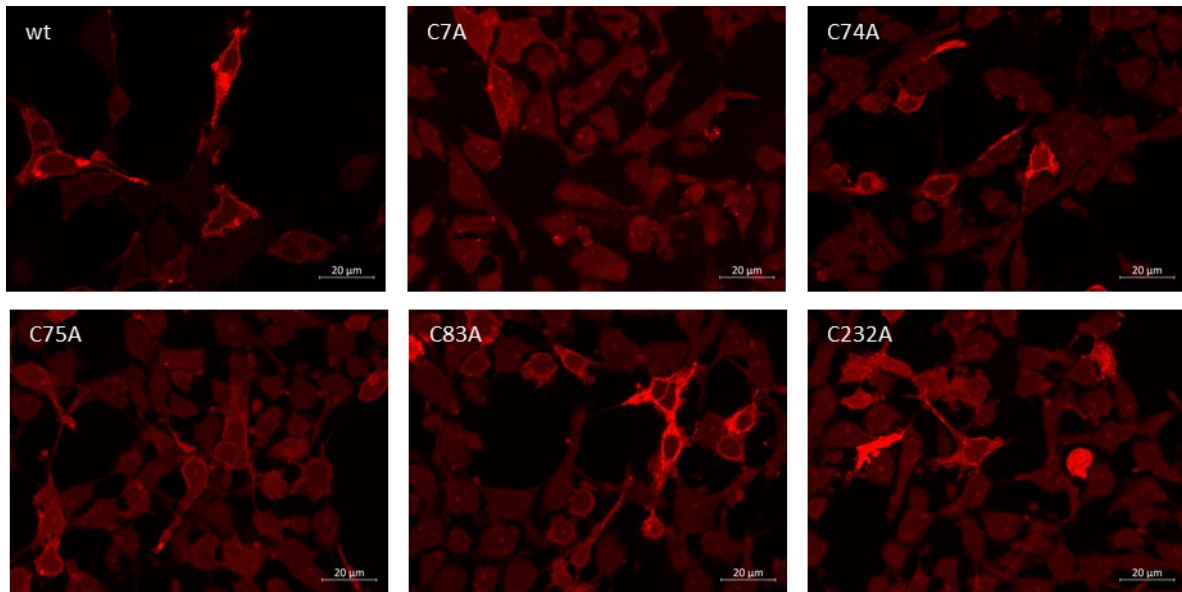
**Abbildung 32: Schematische Darstellung des mCherry-Konstruktes von Tetraspanin-8.**

Abgebildet ist eine schematische Darstellung des Tetraspanin-8 Fusionskonstruktes mit mCherry. Tetraspanin 8 besitzt vier Transmembranheices. Beide Termini sind im Cytosol lokalisiert. mCherry wurde C-terminal an Tetraspanin-8 fusioniert.

Repräsentative Aufnahmen, der fixierten Zellen, einer transienten Transfektion, sind in Abbildung 33 zu sehen. Das wildtypische Tetraspanin-8 (Abbildung 33, oben links) war an der Zellmembran lokalisiert. In geringen Mengen konnte es auch im Cytosol detektiert werden. Im Zellkern konnte hingegen, wie erwartet, kein Tetraspanin-8 beobachtet werden. Bei der Mutante C7A konnte eine gleichmäßigere Verteilung des Proteins beobachtet werden, weder war es primär an der Zellmembran, noch wurden die Zellkerne eindeutig von einer Expression ausgespart (Abbildung 33, oben Mitte). Die Mutante C74A war von der

Verteilung dem Wildtyp ähnlicher, da wieder eine deutliche Membranlokalisierung vorlag. Auch der Zellkern war wieder frei von Tetraspanin. Jedoch gab es im Vergleich zum Wildtyp mehr Zellen, die eine gleichmäßige Verteilung des Tetraspanin-Proteins über die ganze Zelle aufwiesen. Bei der Mutante C75A konnte nur noch eine verhältnismäßig geringe Lokalisation an der Zellmembran beobachtet werden. Diese Mutante verhielt sich ähnlicher zur Mutante C7A als zum wildtypischen Tetraspanin-8. Auch konnte hier eine Distribution des Proteins gleichmäßig in der ganzen Zelle beobachtet werden und nur gelegentlich war eine Membranlokalisierung zu sehen. Bei der Mutante C83A konnte wieder bei mehr Zellen eine Lokalisation des Tetraspanin-Proteins an der Zellmembran detektiert werden. Auch im Zellkern war meist kein Tetraspanin-8 vorhanden. Diese Mutante verhielt sich also wildtypisch. Eine Membranstellung des Proteins konnte auch bei der Mutante C232A detektiert werden. Die Lokalisation war damit dem Wildtyp ähnlich. Bei den intensiven Spots auf der Aufnahme handelt es sich um mCherry-Aggregate. Dies kann bei einer Überexpression von Fremdproteinen vorkommen und muss für die Analyse der Lokalisation vernachlässigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mutation C7A die größten Auswirkungen auf die Lokalisation des Tetraspanin-8 hatte. Die Mutanten C75A war dieser ähnlich, jedoch konnte hier bereits wieder eine Membranlokalisierung erkannt werden. Die Mutanten C74A und C232A zeigten wieder eine deutliche Membranständigkeit des Tetraspanins. Die Mutante C83A verhielt sich wildtypisch. Somit scheinen die Cysteine 7 und 75 eine wichtige Rolle bei der Membranverankerung von Tetraspanin-8 zu spielen und sollten genauer untersucht werden.



**Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von HEK293 transfiziert mit mCherry-Konstrukten von Tetraspanin-8 und fünf Cystein-Mutanten.**

Expression von TSPAN8\_mCherry, sowie der Mutanten von Tetraspanin-8 C7A, C74A, C75A, C83A und C232A in HEK293 Zellen. Die Mutanten C7A und C75A unterscheiden sich in der Lokalisation vom Wildtyp. Die Mutanten C74A, C83A und C232A zeigen eine ähnliche Lokalisation zum Wildtyp. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 60 h, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf einem Deckgläschen kultiviert und anschließend mit Paraformaldehyd und Mowiol fixiert. Repräsentative Aufnahmen der mCherry Fluoreszenz werden gezeigt. ApoTome Aufnahme mit dem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop.

#### 4.2.2.4 Die Mutation aller Palmitoylierungsstellen führt *in vivo* nicht zu einer veränderten Oligomerisierung

In Kooperation mit Daniel Wirth und Kalina Hristova (John Hopkins University, Whiting School of Engineering, Baltimore, MD, USA) wurde die Oligomerisierung von Tetraspanin-8 *in vivo* untersucht. Dazu wurde sowohl das wildtypische Tetraspanin-8 als auch die Variante ohne Palmitoylierungsstellen (Mutationen: C7A, C74A, C75A, C83A, C232A, im folgenden Tetraspanin-8- $\Delta$ Palmitoylierung) entweder mit einem YFP (gelb fluoreszierendes Protein, engl.: *yellow fluorescent protein*) oder mit einem mTurquoise (Cyanblaues fluoreszierendes Protein) genetisch fusioniert, analog zur Herstellung der mCherry-Konstrukte (vgl. Abbildung 32). Die kodierenden Plasmide wurden anschließend für die Analyse in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Oligomerisierung von Tetraspanin-8 und Tetraspanin-8- $\Delta$ Palmitoylierung wurde mittels *Fully Quantified Spectral Imaging-FRET* (FSI-FRET, [174]) analysiert. Durch diese Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Tetraspanin-8 keine höheren Oligomere ausbildet und in der Plasmamembran in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt [persönliche Mitteilung]. Für das Tetraspanin-8 Dimer konnte eine große Dissoziationskonstante und damit eine kurze Lebensdauer nachgewiesen werden [persönliche Mitteilung]. Des Weiteren konnte durch die FSI-FRET-Messungen gezeigt werden, dass die Palmitoylierungen keinen Einfluss auf die Dimerisierung von Tetraspanin-8 zu haben scheint [persönliche Mitteilung].

## 4.2.3 Diskussion

### 4.2.3.1 Tetraspanin-8 kann heterolog aus *E. coli* gewonnen werden

Die heterologe Expression von Tetraspanin-Proteinen ist in der Literatur bisher nur wenig beschrieben. So konnten Tarry *et al.* keine nennenswerte Expression eines Tetraspanin-8-GFP-Fusionskonstrukts in *E. coli* beobachten [175]. Weitere untersuchte Tetraspanin-Proteine konnten in diesem System erfolgreich exprimiert werden, während andere ähnlich zu Tetraspanin-8 keine Expression zeigten [175]. Des Weiteren konnte ein GFP-Fusionskonstrukt von Tetraspanin-8 von Skaar *et al.* in *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) erfolgreich exprimiert werden [176]. Jedoch wurde in beiden Fällen eine große lösliche Domäne in Form des GFP (*Green Fluorescent Protein*) an das Tetraspanin fusioniert. Eine Expression mit einem fusionierten MBP (*Maltose Binding protein*) konnte in *E. coli* nicht erfolgreich durchgeführt werden (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). CD81 (Tetraspanin-28) konnte mit einem His-tag in *Pichia pastoris* (Hefe) exprimiert werden [177]. Weiterhin konnte es mit einem kurzen rho1D4-tag (neun Aminosäuren) in HEK293 exprimiert und anschließend gereinigt werden [178]. Dies zeigt deutlich, dass für die Expression von Tetraspanin-Proteinen die unterschiedlichsten Konstrukte und Zellsysteme verwendet werden. Durch Vergleich der in der Literatur beschriebenen Expression von Tetraspanin-Proteinen konnte festgestellt werden, dass eine Expression in Hefe-Zellen generell ergiebiger ist als in *E. coli*. Dies könnte darauf beruhen, dass Hefezellen zu den Eukaryoten zählen, während *E. coli*-Bakterien zu den Prokaryoten gehören. Somit geben die Hefezellen eine natürlichere Umgebung für die humanen Tetraspanin-Proteinen wieder. In HEK-Zellen ist die Expression mit posttranslationalen Modifikationen möglich, welche in *E. coli* gar nicht und in Hefe-Zellen nur bedingt erfolgen [5]. Für die heterologe Expression eines Tetraspanin-Proteins gibt es somit kein einheitliches Protokoll und diese muss aufgrund dessen stets neu optimiert werden. In dieser Arbeit konnte erstmals eine heterologe Expression von Tetraspanin-8 in *E. coli* Tuner(DE3)pLysS durchgeführt werden (Abbildung 25). Der Stamm Tuner(DE3)pLysS zeichnet sich dadurch aus, dass er eine sensitive Kontrolle der Expression über die eingesetzte IPTG-Konzentration ermöglicht [179]. Des Weiteren wird eine basale Expression der T7 RNA Polymerase durch die Expression von T7 Lysozym verhindert [179]. Da alle anderen *E. coli*-Stämme keine Expression zeigten, scheint Tetraspanin-8 eine negative Auswirkung auf die Bakterien zu haben. Die gezieltere Expression in Tuner(DE3)pLysS wirkt diesem Effekt entgegen und ermöglicht es Tetraspanin-8 zu erhalten.

Für die Proteinreinigung des Tetraspanin-8 konnte ein Reinigungsprotokoll etabliert werden (Abbildung 28). Dabei wurde festgestellt, dass mit n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) eine erfolgreiche Solubilisation des Proteins aus der *E. coli* Membran möglich ist (Abbildung 26). DDM wird häufig für die Solubilisation von Membranproteinen verwendet, da auch Oligomere Membrankomplexe erhalten bleiben [180]. Da Tetraspanin-Proteine häufig in oligomeren Komplexen

vorliegen ist die Verwendung dieses Detergenz ideal, um eine möglichst natürliche Umgebung des Proteins zu erhalten. Bei der Bindung an das Säulenmaterial (Ni-NTA Agarose) konnte festgestellt werden, dass zunächst ein Dimer von Tetraspanin-8 detektiert werden (Abbildung 27). Nach längerer Inkubation mit dem Säulenmaterial wurde eher Monomer detektiert und die unspezifische Bindung nahm zu. Die Detektion von dimerem Tetraspanin-8 nach kurzer Inkubationszeit mit dem Säulenmaterial lässt vermuten, dass Tetraspanin-8 in DDM-Mizellen als Dimer vorliegt. Durch eine längere Inkubation mit dem Säulenmaterial erhöht sich die Chance, dass der His-Tag des zweiten Tetraspanin-8 an einen anderen Agarose-Bead bindet als der Tag des ersten Tetraspanin-8. Dies könnte zu einer Monomerisierung des Tetraspanin-8 führen, wenn genug DDM im Puffer ist um eine komplette Mizelle um jedes Monomer auszubilden. Zur weiteren Analyse dieser Dimerisierung könnte die Konzentration des DDMs im Puffer verändert werden, womit zusätzlich Auskünfte über die Stabilität des Dimers getroffen werden könnten. Bei der Proteinreinigung über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie konnten geringe Mengen Tetraspanin-8 erhalten werden (Abbildung 28). Tetraspanin-8 konnte in der löslichen Fraktion detektiert werden. Dies wurde nicht erwartet, da es sich bei Tetraspanin-8 um ein Membranprotein handelt. Die Ursache für diese Lokalisation kann ohne weitere Untersuchungen nicht geklärt werden. Würde eine Fehlfaltung des Proteins vorliegen, so wäre es in der Fraktion des Einschlusskörperchen detektiert worden [181]. Eine Möglichkeit ist, dass sich das Tetraspanin-8 in einer nicht sedimentierenden Membranfraktion befindet. Diese würde trotz Ultrazentrifugation in Lösung verbleiben [182]. Da nur mit der Membranfraktion gearbeitet wurde, könnte eine Verwendung des Tetraspanin-8 in der löslichen Fraktion eine deutliche Steigerung der Ausbeute liefern, sofern das Protein in seiner natürlichen Konformation vorliegt. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen könnte des Weiteren zu einer stärkeren Expression von Tetraspanin-8 führen. Möglichkeiten hierfür sind die Zugabe von Glucose oder Veränderung der IPTG-Konzentration [168, 169].

In dieser Arbeit konnte erstmals die heterologe Expression von Tetraspanin-8, mit fusioniertem His-tag, in *E. coli* mit anschließender Proteinreinigung über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie gezeigt werden.

#### **4.2.3.2 Die Oligomerisierung von Tetraspanin-8 wird nicht von den Palmitoylierungsstellen beeinflusst**

Über das GALLEX-System wurde die Oligomerisierung von Tetraspanin-8, sowie der Einfluss von Einzelmutationen der Palmitoylierungsstellen Tetraspanin-8 analysiert (siehe Kap. 4.2.2.1, 4.2.2.2, Abbildung 29).

In *E. coli* werden keine posttranslationalen Modifikationen, also auch keine Palmitoylierungen, durchgeführt [5]. Palmitoylierungen haben jedoch einen Einfluss auf die Interaktion von Tetraspanin-Proteinen untereinander und mit anderen Proteinen, sowohl in der Membran als auch extrazellulär. Ein Einfluss der Palmitoylierung konnte für die Interaktionen von CD81 (Tetraspanin-28) [173, 183], CD9 (Tetraspanin-29) [183] und CD151 (Tetraspanin-24) [172, 184] beobachtet werden. In dieser Arbeit konnte mittels des GALLEX-Systems eine Dimerisierung von Tetraspanin-8 beobachtet werden. Die Interaktion ist vergleichbar mit der Mutante GpA\_G83I und damit relativ schwach. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die fehlende Palmitoylierung in *E. coli* wichtig für die Dimerisierung von Tetraspanin-8 ist. Die gemessene Dimerisierung von Tetraspanin-8 könnte durch andere Wechselwirkungen, unabhängig von der Palmitoylierung erklärt werden. Zur Charakterisierung dieser Wechselwirkung sind weitere Untersuchungen nötig.

Durch Einzelmutation der Cystein-Seitenketten im Tetraspanin-8 wurde deren Einfluss auf die Dimerisierung untersucht. Für die Tetraspanin-Proteine CD51 [172] und CD81 [173] konnte durch Mutation dieser Cystein-Seitenketten ein Unterschied in der Interaktion beobachtet werden. Die Einzelmutationen der Cysteine am Übergang zur Membran haben keinen Einfluss auf die Oligomerisierung von Tetraspanin-8 (siehe Kap. 4.2.2.2, Abbildung 31). Dies könnte durch die fehlende Palmitoylierung in *E. coli* begründet sein. Damit konnte der reine Einfluss der Cystein zu Alanin Mutation beobachtet werden. Dabei hat keine der untersuchten Mutationen einen Einfluss auf die Oligomerisierung von Tetraspanin-8. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Einzelmutanten in einer wildtypischen Konformation vorlagen und dementsprechend keine Veränderung in der Dimerisierung zu beobachten war. Des Weiteren scheinen die Cysteine an sich (nicht palmitoyliert) keinen Einfluss auf die Dimerisierung zu haben und sind nicht direkt daran beteiligt.

Des Weiteren konnte in Zusammenarbeit mit Daniel Wirth und Kalina Hristova (John Hopkins University, Whiting School of Engineering, Baltimore, MD, USA) festgestellt werden, dass die Dimerisierung von Tetraspanin-8 *in vivo* nicht durch die Palmitoylierung beeinflusst wird. Die Dimerisierung der Mutante Tetraspanin-8- $\Delta$ Palmitoylierung war mit der des Wildtyps vergleichbar [persönliche Mitteilung].

#### **4.2.3.3 Palmitoylierungen haben einen Einfluss auf die Lokalisation von Tetraspanin-8**

Palmitoylierungen wurden bereits für einige Tetraspanin-Proteine nachgewiesen [183]. Der Einfluss der Palmitoylierung auf die Lokalisation von Tetraspanin-8 wurden in dieser Arbeit untersucht.

Bei den meisten untersuchten Tetraspanin-Proteinen konnte kein Einfluss der Palmitoylierung auf die Lokalisation beobachtet werden. CD81 (Tetraspanin-28) wurde an der Zellmembran von transfizierten

HEK293 nachgewiesen [178]. Durch Blockierung der Palmitoylierung konnte keine Veränderung in der Lokalisation in Huh7-Zellen (Leberkarzinomzellen) beobachtet werden [185]. Dies wurde ebenfalls von Delandre *et al.* für mit CD81 transfizierte BHK-Zellen (*Baby Hamster Kidney*-Zellen) beobachtet [173]. Bei CD151 (Tetraspanin-24) konnte bei einer Expression in Rat-1-Zellen (Fibroblasten) ebenfalls kein Einfluss der Palmitoylierung auf die Lokalisation detektiert werden [172]. Dagegen konnte in MCF-7-Zellen (Brustkrebszelllinie) eine veränderte Lokalisation von CD151 beobachtet werden [184]. Diese Unterschiede könnten durch das unterschiedliche Zellsystem oder unterschiedliche Konstrukte hervorgerufen werden. Berditchevski *et al.* begründen die veränderte Lokalisation von CD151, welche von Yang *et al.* [184] publiziert wurde, in dem fusionierten GFP (*Green fluorescent Protein*) [172]. Dies könnte im Fall von Tetraspanin-8 ebenfalls die Ursache für die veränderte Lokalisation sein, da das fusionierte mCherry eine ähnliche Größe wie GFP hat. Die Lokalisation des Wildtyp wurde jedoch nicht durch die Fusion von mCherry beeinflusst (Abbildung 33). Es konnte festgestellt werden, dass die Mutation von Cystein 7 und Cystein 75 des Tetraspanin-8 zu einer deutlich veränderten Lokalisation führten (Abbildung 33). Die veränderte Lokalisation kann unterschiedliche Ursachen haben. Die fehlenden Palmitoylierungen könnten einen Einfluss auf das Trafficking von Tetraspanin-8 beeinflussen. Dies könnte zu der veränderten Lokalisation führen. Zum anderen könnte die Interaktion mit anderen Proteinen verändert sein, da die Palmitoylierung von Tetraspanin-Proteinen für die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig ist [186]. Wenn Tetraspanin-8 im Komplex mit einem Interaktionspartner zur Membran transportiert wird, dann kann dieser Transportprozess beeinflusst sein, wenn die Interaktion zwischen den Proteinen nicht mehr stattfindet. Des Weiteren könnte auch die Cystein-Seitenkette an sich wichtig für die Lokalisation sein, indem es z.B. einen Einfluss auf die Struktur des Proteins hat. Um die Ursache der veränderten Lokalisation genauer zu erklären sind in Zukunft weiterführende Experimente nötig, die unter anderem auch den Einfluss von Interaktionspartnern mit einbezieht. In der Literatur wurden stets Mutanten ohne Palmitoylierung, bzw. mit minimaler Palmitoylierung betrachtet. In dieser Arbeit wurde dagegen der Einfluss einzelner Palmitoylierungsstellen betrachtet. Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Literatur sollte in Zukunft auch eine Mutante von Tetraspanin-8 ohne Palmitoylierungen betrachtet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cystein-Seitenketten 7 und 75 wichtig für die Lokalisation von Tetraspanin-8 sind.

## 4.3 Claudin-7

Claudin-7 ist ein Protein der Claudin-Superfamilie. *In vivo* bilden diese Proteine *tight junctions* aus, welche dichte Verbindungen zwischen Zellen herstellen. Claudin-Proteine besitzen vier Transmembranhelices und beide Termini liegen im Cytosol. Die extrazellulären Loops bilden eine Domäne mit  $\beta$ -Faltblattstruktur aus (siehe Abbildung 7, Kapitel 1.4) [94]. In dieser Arbeit soll die Struktur und Funktion von Claudin-7 *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

### 4.3.1 Dimerisierung und Lokalisation von Claudin-7 *in vivo*

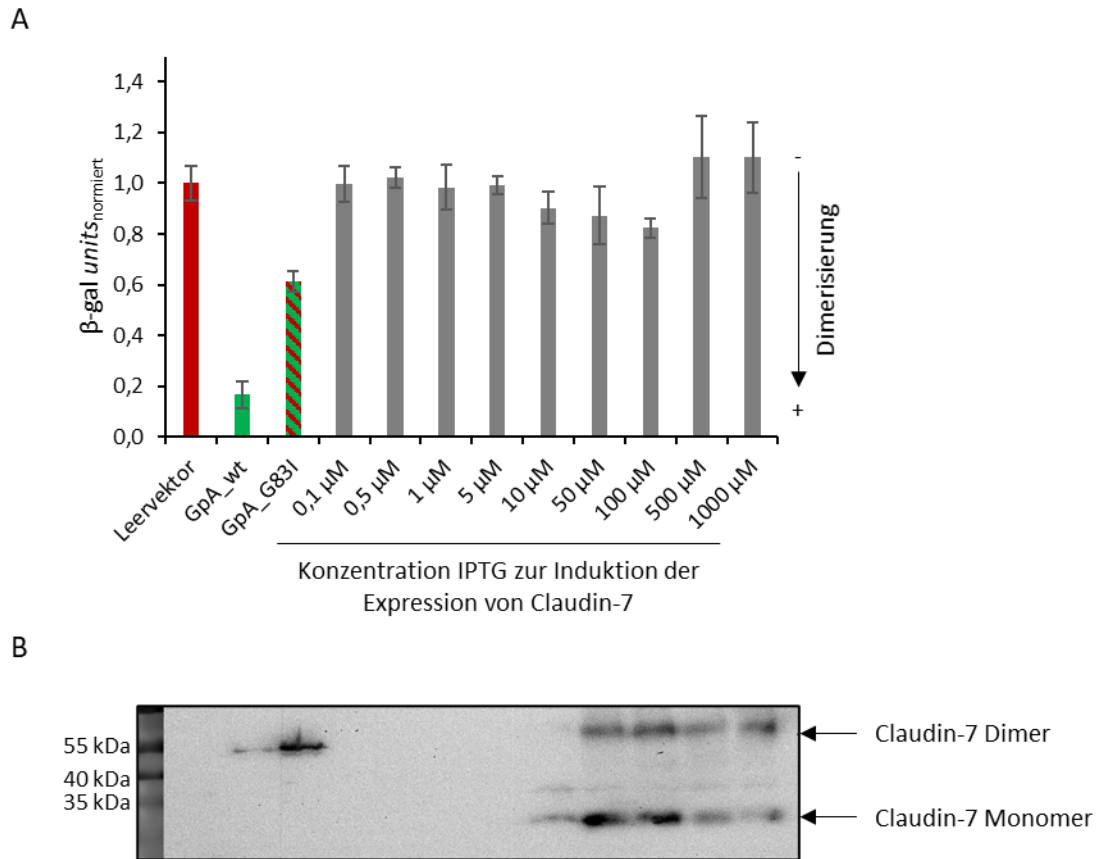
#### 4.3.1.1 Die IPTG-Konzentration hat einen Einfluss auf die Expression von Claudin-7

Claudin-7 bildet mit anderen Claudin-Proteinen *tight junctions* aus, die sich kettenförmig anordnen. Das GALLEX-System [133] sollte genutzt werden, um diese Oligomerisierung *in vivo* zu detektieren. Das Prinzip des GALLEX-Systems wurde bereits in den Kapiteln 3.3.14 und 4.2.2 beschrieben.

Zur Ermittlung der Bedingungen für eine maximale Dimerisierung wurde die IPTG-Konzentration moduliert. Die ermittelten  $\beta$ -gal *units* bei steigender IPTG-Konzentration für Claudin-7 sind in Abbildung 34 A dargestellt.

Das GALLEX-Experiment konnte erfolgreich durchgeführt werden, da GpA einen hohen Dimerisierungsgrad aufwies. Eine Dimerisierung von Claudin-7 ist unter den gewählten Bedingungen nur schwer zu detektieren. In Kombination mit der Analyse des Expressionsniveaus (Western Blot-Analyse, Abbildung 34 B) konnte festgestellt werden, dass erst ab 10  $\mu$ M IPTG eine minimale Expression detektiert werden konnte. Bei einer IPTG-Konzentration von 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M konnte ein maximales Expressionsniveau von Claudin-7 beobachtet werden. Bei weiterer Erhöhung der IPTG-Konzentration nimmt die Expression von Claudin-7 wieder ab. Ebenfalls konnte bei 100  $\mu$ M die maximale Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment detektiert werden. Bei der weiteren Erhöhung der IPTG-Konzentration konnte keine Dimerisierung detektiert werden. Die detektierte Dimerisierung bei 100  $\mu$ M IPTG ist laut GALLEX-Experiment gering, da die Mutante des GpA (GpA\_G83I) einen höheren Dimerisierungsgrad aufweist. Dies steht im Kontrast zum Ergebnis der Western Blot-Analyse, da hier ein Claudin-7 Dimer trotz SDS im Probenpuffer detektiert werden konnte.

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass das GALLEX-System für Claudin-7 nur bei einer Induktion mit 100  $\mu$ M IPTG eine minimale Dimerisierung von Claudin-7 detektieren konnte, obwohl in der Western-Blot Analyse Dimere detektiert werden konnten.



**Abbildung 34: Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment.**

Bei steigender IPTG-Konzentration wurde die Homodimerisierung und Expression von Claudin-7 im GALLEX-System analysiert. (A) Aufgetragen sind die normierten  $\beta$ -gal units der *in vivo* Homodimerisierung von Claudin-7 in SU101-Bakterien bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung). Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMalp2. Als Positivkontrolle diente die Transmembranhelix des Glycophorin A (GpA). Die Mutante von GpA\_G83I (Glycin 83 zu Isoleucin) zeigt ein vermindertes Dimerisierungsverhalten. Die Normierung erfolgt auf den Mittelwert der Negativkontrolle und wird auf 1,0 gesetzt. (B) Western Blot-Analyse des SU101 NaOH-Extraktes zur Ermittlung des Expressionsniveaus. Dazu wurden Proben nach erfolgter Expression genommen, sodass eine  $OD_{600} = 1,0$  vorliegt. Die Bakterien wurden pelletiert und einer NaOH-Extraktion unterzogen. Von den verdauten Proben wurden 10  $\mu$ L auf ein SDS-Gel geladen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. GpA\_LexA besitzt eine Größe von etwa 26 kDa, Claudin-7-LexA von etwa 32 kDa. Vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) wurden 5  $\mu$ L aufgetragen. Als Erstantikörper diente LexA DNA Binding Region Antibody, als Zweitantikörper wurde Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase verwendet.

#### 4.3.1.2 Claudin-7 konnte *in vivo* nicht an der Membran detektiert werden

Ein Fusionsprotein aus Claudin-7 mit dem löslichen Fluorophoren-Protein mCherry wurde in HeLa-Zellen und in L-cells transfiziert. Die Lokalisation sollte anschließend über Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Die Analyse der Zellen ergab, eine cytosolische Lokalisation des Claudin-7-mCherry-Konstruktes (Abbildung 82, Anhang).

Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation in eukaryotischen Zellen wurde ein FLAG-Tag an Claudin-7 fusioniert, welcher nur acht Aminosäuren lang ist. Dieser kann über Immunodetektion mit Antikörpern

nachgewiesen werden. Auch eine Transfektion dieses Fusionsproteins führte nicht zu einer Membranlokalisation von Claudin-7 (Abbildung 83, Anhang).

Die Betrachtung von Claudin-7 in eukaryotischen Zellen bedarf weiterer Optimierungen, da nicht die erwartete Lokalisation an der Zellmembran beobachtet werden konnte.

### **4.3.2 Heterologe Expression in *E. coli* und Proteinreinigung**

Um eine genaue Analyse der Struktur und Funktion von Claudin-7 zu ermöglichen, wird das Protein in ausreichender Menge und Reinheit benötigt. Hierzu wurden zunächst diverse *E. coli*-Stämme für eine heterologe Expression analysiert. Anschließend wurde das Protein mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelate chromatography*, IMAC) gereinigt.

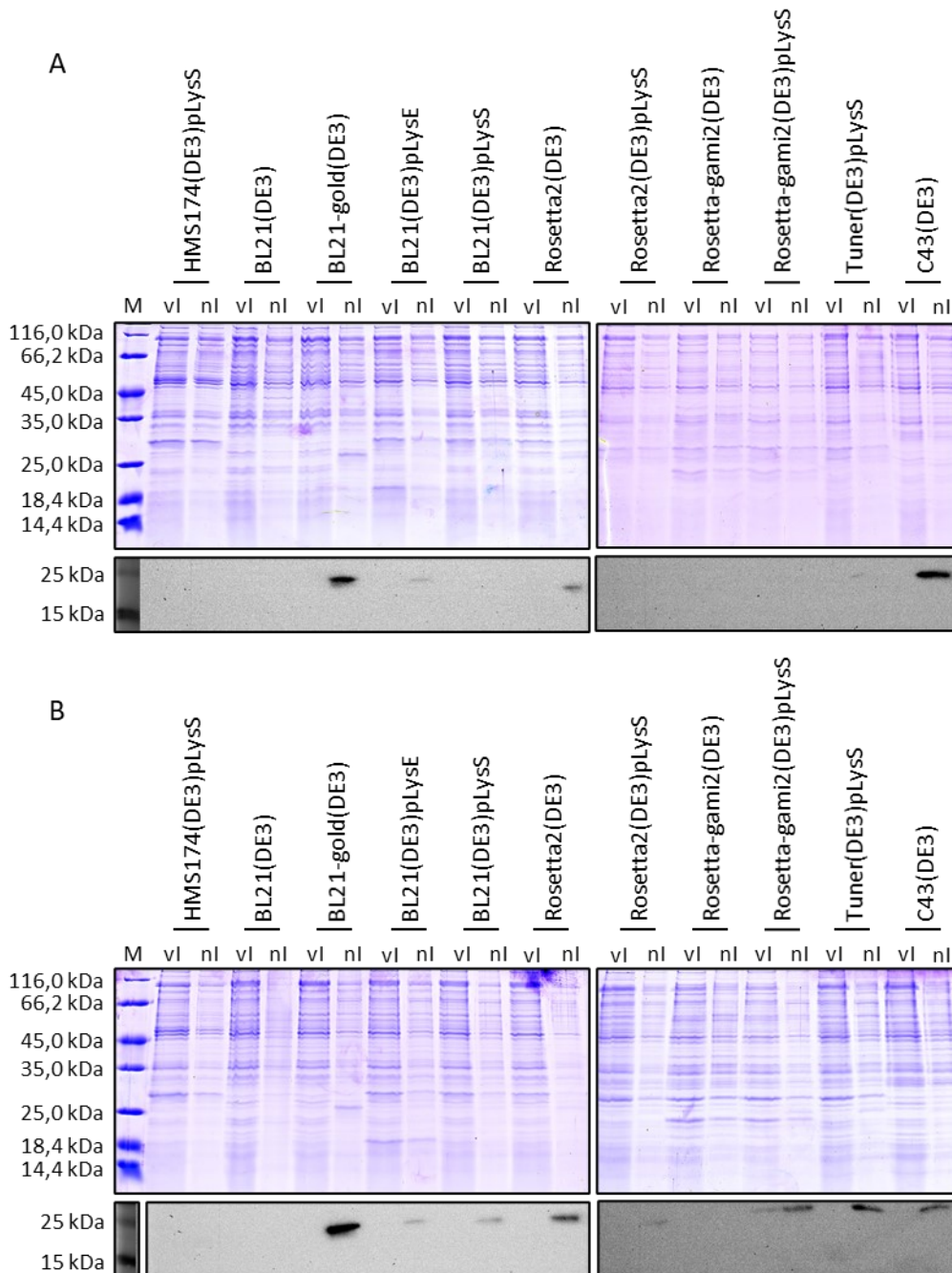
#### **4.3.2.1 Claudin-7 kann in diversen *E. coli*-Stämmen heterolog exprimiert werden**

Zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen von humanem Claudin-7 (etwa 26 kDa) wurde eine Testexpression (siehe Kap. 3.2.3) durchgeführt. Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression ist in Abbildung 35 dargestellt.

Eine Transformation des Vektors pET\_His6\_StrepII\_Cldn7 in die *E. coli*-Stämme Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS und Tuner(DE3) konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden.

In Abbildung 35 A ist die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von Claudin-7 für drei Stunden bei 37 °C dargestellt. Es konnte eine Expression von Claudin-7 in den *E. coli*-Stämmen BL21-gold(DE3) und C43(DE3) detektiert werden. Die Stämme BL21(DE3)pLysE, Rosetta2(DE3) und Tuner(DE3)pLysS exprimierten Claudin-7 unter diesen Bedingungen in geringen Mengen. In allen weiteren untersuchten *E. coli*-Stämmen konnte keine Expression von Claudin-7 detektiert werden.

Werden die Expressionsbedingungen verändert, sodass die Expression über Nacht und bei 20°C erfolgte (vgl. Abbildung 35 B), so konnte beobachtet werden, dass Claudin-7 in mehr *E. coli*-Stämmen exprimiert werden konnte als bei einer Expression für drei Stunden, bei 37 °C. Die größte Menge an Claudin-7 konnte dabei für den *E. coli*-Stamm BL21-gold(DE3) detektiert werden. Die Stämme Rosetta2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3)pLysS und C43(DE3) exprimierten Claudin-7 ebenfalls gut. Dagegen konnte in den Stämmen BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS und Rosetta2(DE3)pLysS nur eine schwache Expression von Claudin-7 detektiert werden. In den Stämmen HMS174(DE3)pLysS, BL31(DE3) und Rosetta-gami2(DE3) konnte auch weiterhin keine Expression von Claudin-7 beobachtet werden.



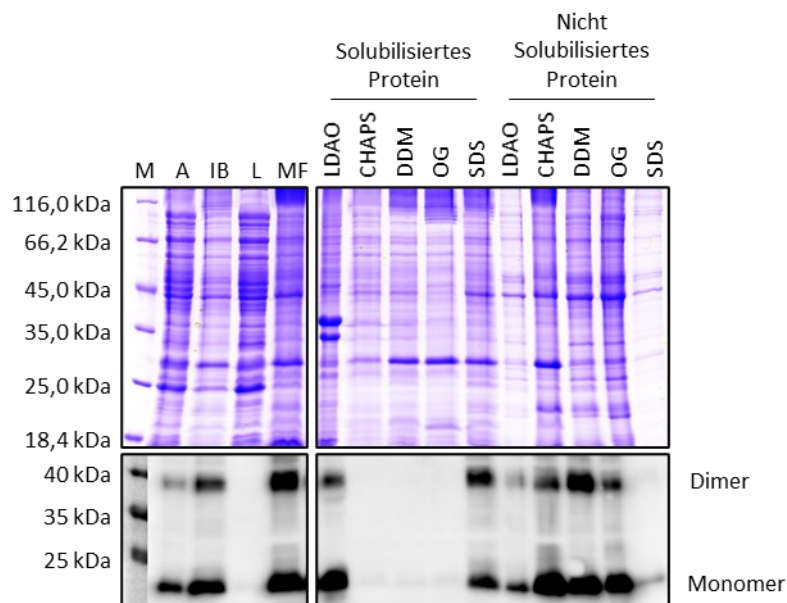
**Abbildung 35: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von Claudin-7.**

Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 14 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), Tuner(DE3)pLysS und C43(DE3). Die Claudin-7 Bande wurde bei etwa 26 kDa erwartet. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion von Claudin-7 mit His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5  $\mu$ L einer Probe mit  $OD_{600} = 0,5$ . Vom Marker (M) wurden 5  $\mu$ L Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen. (A) Expression von Claudin-7 nach Induktion mit IPTG für 3 h bei 37 °C. Eine Expression von Claudin-7 konnte in den Stämmen BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, Rosetta2(DE3) und C43(DE3) beobachtet werden. (B) Expression von Claudin-7 nach Induktion mit IPTG über Nacht bei 20 °C. Eine Expression von Claudin-7 konnte in den Stämmen BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3)pLysS und C43(DE3) beobachtet werden.

Da eine Claudin-7 Expression über Nacht in mehreren *E. coli*-Stämmen möglich ist, wurde im Folgenden über Nacht bei 20 °C exprimiert. Es wurde eine Expression im großen Maßstab in den Stämmen BL21-gold(DE3), Rosetta2(DE3) und Tuner(DE3)pLysS durchgeführt (vgl. Abbildung 84, Anhang). Dabei konnte festgestellt werden, dass eine maximale Ausbeute von Claudin-7 in Tuner(DE3)pLysS erhalten werden konnte. Somit wurde Claudin-7 im Folgenden in Tuner(DE3)pLysS, über Nacht bei 20 °C exprimiert.

#### 4.3.2.2 Claudin-7 kann mit LDAO aus der *E. coli*-Membran solubilisiert werden

Nach der erfolgreichen Expression von Claudin-7 in Tuner(DE3)pLysS wurde im nächsten Schritt analysiert, mit welchem Detergenz Claudin-7 aus der Membran gelöst werden kann. Hierzu wurden die Detergenzien Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO), 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM) und n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (OG) untersucht. Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) diente hierbei als Positivkontrolle.



**Abbildung 36: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilisationsfähigkeit verschiedener Detergenzien.**

Aufgetragen auf ein 14 %iges SDS-Gel wurden 50  $\mu$ g Gesamtprotein. Vom Marker (M) wurden 5  $\mu$ L aufgetragen. Spur A bezeichnet dabei den Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer LM20, Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, Spur L die lösliche Fraktion und Spur MF die Membranfraktion. Es folgen die solubilierten und nicht solubilierten Fraktionen in den Detergenzien LDAO, CHAPS, DDM, OG und SDS. SDS dient hierbei als Positivkontrolle. Claudin-7 besitzt eine Größe von etwa 26 kDa, während ein Dimer eine erwartete Größe von 52 kDa hat. Monomer und Dimer wurden bei kleineren Molekulargewichten detektiert. In Gegenwart von LDAO wurde Claudin-7 am effektivsten solubilisiert. Die LDAO-Proben wurden TCA gefällt, bevor sie mit 1xPP versetzt wurden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

In Abbildung 36 ist die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse des Aufschlusses (Spur A-MF) der *E. coli*-Bakterien, sowie die Analyse des Einflusses der unterschiedlichen Detergenzien dargestellt. In Spur A wurde der Aufschluss der *E. coli*-Bakterien mittels Microfluidizer aufgetragen. Es konnte Claudin-7 in der Spur A im Western Blot detektiert werden. Im Gegensatz zur Analyse der Expression konnte hier zusätzlich zur Monomerbande (ca. 26 Da) eine Dimerbande (ca. 52 kDa) von Claudin-7 detektiert werden. Jedoch kommt es bei der Detektion im Western Blot zu einer Verschiebung der Molekulargröße zu kleineren Größen hin. In Spur IB wurden Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*) und nicht aufgeschlossene Zellen aufgetragen. Hier konnte Claudin-7 detektiert werden. Die lösliche Fraktion (Spur L) enthielt erwartungsgemäß kein Claudin-7. In der Membranfraktion (Spur MF) konnte Claudin-7 detektiert werden. Anschließend wurde die Membranfraktion in den unterschiedlichen Detergenzien (P-Puffer (Tabelle 1) mit final 4 % CHAPS, 2 % DDM, 4 % LDAO, 4 % OG oder 3 % SDS) aufgenommen. Nach erfolgter Inkubation wurden mittels Ultrazentrifugation die nicht solubilisierten Proteine abgetrennt. In der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse (Abbildung 36) konnte festgestellt werden, dass nur LDAO einen ähnlichen Einfluss auf die Solubilisation von Claudin-7 wie SDS (Positivkontrolle) aufweist. In Anwesenheit von LDAO wurden ein Großteil des in der Membranfraktion enthaltenen Claudin-7 solubilisiert. Nur geringe Mengen wurden in der Fraktion der nicht solubilisierten Proteine detektiert. Bei Nutzung von CHAPS, OG und DDM konnte kein Claudin-7 solubilisiert werden. Die gesamte Menge Claudin-7 befand sich in Gegenwart dieser Detergenzien in der nicht solubilisierten Fraktion.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im folgenden LDAO verwendet, um Claudin-7 aus der Membran zu solubilisieren.

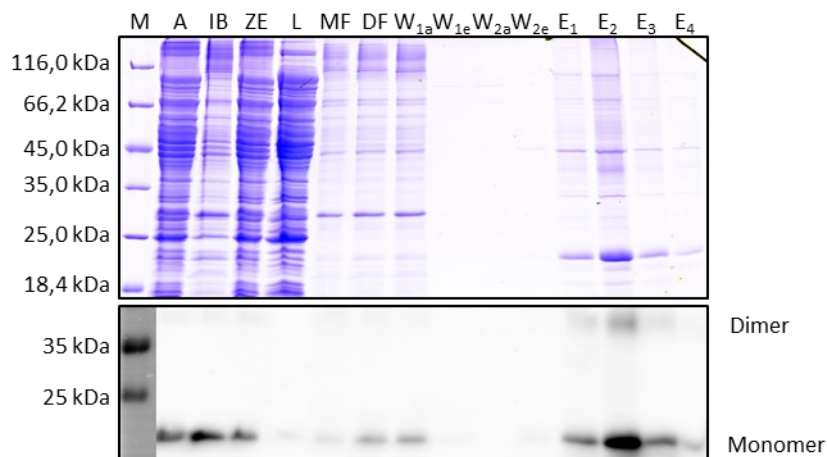
#### **4.3.2.3 Claudin-7 kann über IMAC gereinigt werden**

Mit den ermittelten Optimierungen für die Claudin-7 Reinigung konnte dieses nun rein und mit einer Ausbeute von 1,8 mg pro Liter Expressionskultur erhalten werden.

Die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Reinigung von Claudin-7 ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Probe des Aufschlusses mittels Microfluidizer wurde in Spur A aufgetragen. Es folgen die Spuren der Proben von Einschlusskörperchen und nicht aufgeschlossenen Zellen (IB), Zellextrakt (ZE), lösliche Fraktion (L) und Membranfraktion (MF). Wie bisher beobachtet ging auch hier Claudin-7 in den nicht aufgeschlossenen Zellen und Einschlusskörperchen für die Proteinreinigung verloren. Die lösliche Fraktion enthielt wie erwartet kein Claudin-7. In der Membranfraktion wurde eine geringe Menge an Claudin-7 detektiert. Im Durchfluss (Spur DF) des Ni-NTA-Agarose Säulenmaterials und dem ersten Waschschrift ( $W_{1a}$ ) gingen geringe Mengen an Claudin-7 verloren, da sie von der Säule eluiert wurden,

bzw. nicht gebunden hatten. Durch die weiteren Waschschrte konnte kein weiteres Protein von der Säule gewaschen werden. In den Elutionsfraktionen (Spur E<sub>1</sub> bis E<sub>4</sub>) wurde reines Claudin-7 eluiert. Es konnte ein Bandenmuster aus Monomerbande, Dimerbande und höheren Oligomerbanden beobachtet werden.

Eine Reinigung von Claudin-7 nach dem optimierten Reinigungsprotokoll führt zu Claudin-7 in ausreichender Menge und Reinheit. Da das exprimierte Claudin-7-Konstrukt zusätzlich zum His-tag noch einen *Strep*-Tag II enthält, wurde im Folgenden untersucht, ob eine weitere Reinigung über eine *Strep*-Tactin®-Säule erfolgen kann.



**Abbildung 37: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Claudin-7 Reinigung mittels IMAC.**

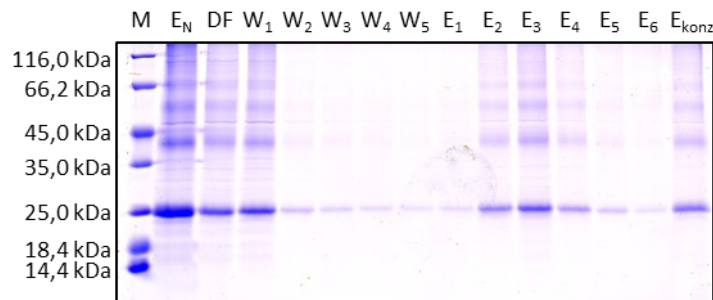
Aufgetragen auf ein 12 %iges SDS-Gel wurden je 50 µg Gesamtprotein der Proben des Proteinaufschlusses (Spur A, IB, ZE, L, MF) und mit dem Volumen der Membranfraktion (MF, 11 µL) die Proben der Proteinreinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie. In Spur A wurde der Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer aufgetragen, in Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, in Spur ZE das Zellextrakt, in Spur L die lösliche Fraktion und in Spur MF die solubilisierte Membranfraktion. In Spur DF wurde anschließend der Durchfluss der Ni-NTA-Agarose Säule aufgetragen. Nun folgen zwei Waschschrte, wobei jeweils eine Probe vom Anfang der Waschung <sub>a</sub> und vom Ende der Waschung <sub>e</sub> aufgetragen wurden. W<sub>1</sub> entspricht 5 mM Imidazol und W<sub>2</sub> 50 mM Imidazol. Anschließend wurde in 2 mL-Schritten mit 500 mM Imidazol Claudin-7 von der Säule eluiert (Spur E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>). Die Claudin-7 Monomerbande wurde bei 26 kDa erwartet, das Dimer bei 52 kDa. Claudin-7 konnte mit hohem Reinheitsgrad erhalten werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

#### 4.3.2.4 Eine zusätzliche Reinigung über eine *Strep*-Tactin®-Säule erhöht den Reinheitsgrad von Claudin-7 nicht

Nach der Reinigung von Claudin-7 über eine IMAC erfolgte in einem zweiten Reinigungsschritt die Reinigung über eine *Strep*-Tactin®-Säule.

In Abbildung 38 ist die SDS-PAGE-Analyse des zweiten Reinigungsschrittes der Claudin-7 Reinigung über eine *Strep*-Tactin®-Säule abgebildet. Dabei wurde in Spur E<sub>N</sub> eine Probe des Eluates nach der IMAC aufgetragen. In Spur DF wurde die Probe des Durchflusses der Säule aufgetragen. Hier konnte erkannt werden, dass eine nicht zu vernachlässigende Menge an Claudin-7 nicht an die Säule gebunden hat.

Etwa die gleiche Menge an Claudin-7 ging im ersten Waschschrift verloren. Bei den weiteren Waschschriften wurden ebenfalls geringe Mengen an Protein von der Säule eluiert. Jedoch verbleibt auch Claudin-7 an der Säule gebunden, welches dann in den Elutionsschritten (Spur E<sub>1</sub> bis E<sub>6</sub>) eluiert werden konnte. In Spur E<sub>konz</sub> wurden die aufkonzentrierten und umgepufferten Eluate E<sub>1</sub> bis E<sub>6</sub> aufgetragen. Vergleicht man diese Spur mit dem Eluat nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Spur E<sub>N</sub>), so konnte festgestellt werden, dass beide Spuren dasselbe Bandenmuster aufweisen. Lediglich die Bandenintensitäten unterschieden sich.



**Abbildung 38: SDS-PAGE-Analyse der Claudin-7 Reinigung über eine *Strep-Tactin*®-Säule.**

Aufgetragen auf ein 14 %iges SDS-Gel, wurden je 12,5 µL der Proben der Proteinreinigung mittels *Strep-Tactin*®-Säule. Spur E<sub>N</sub> bezeichnet dabei das Eluat nach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie, Spur DF den Durchfluss, die Spuren W<sub>1</sub> bis W<sub>5</sub> die Waschungen mit fünf Säulenvolumen SW-Puffer, die Spuren E<sub>1</sub> bis E<sub>6</sub> die Elution mit sechs halben Säulenvolumen SE-Puffer und die Spur E<sub>konz</sub> die aufkonzentrierten und in P-Puffer, 0,1 % DDM umgepufferten Eluate. Die Claudin-7 Bande wurde bei 26 kDa erwartet, das Dimer bei 52 kDa. Bei einem zweiten Reinigungsschritt konnten keine weiteren Verunreinigungen abgetrennt werden. Es wurde nur eine Verringerung der Claudin-7 Ausbeute beobachtet. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.

Durch einen zweiten Reinigungsschritt über eine *Strep-Tactin*®-Säule konnte kein erhöhtes Maß an Reinheit von Claudin-7 erreicht werden. Der zweite Reinigungsschritt resultierte in einer deutlich verringerten Ausbeute und wurde deswegen im Folgenden nicht mehr durchgeführt.

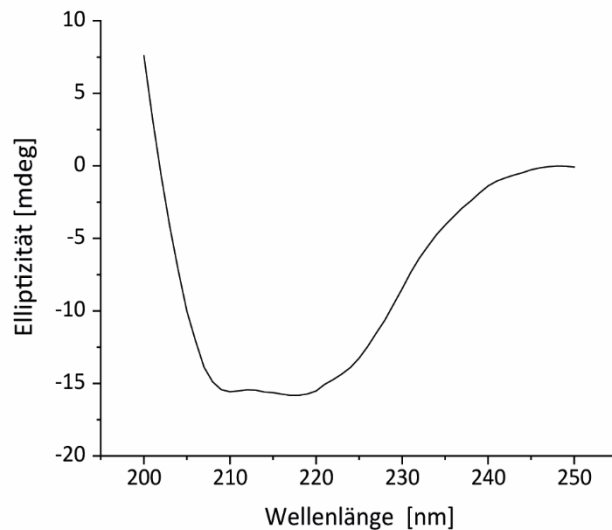
### 4.3.3 Betrachtung der Sekundärstruktur von Claudin-7 mittels CD-Spektroskopie

Mithilfe der CD-Spektroskopie können Aussagen über die Sekundärstruktur von Proteinen getroffen werden. Für Claudin-7 wurde die CD-Spektroskopie genutzt, um die Faltung des Proteins nach der Reinigung zu analysieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit Claudin-7 durch Hitze destabilisiert, bzw. entfaltet werden kann.

#### 4.3.3.1 Claudin-7 besitzt eine hauptsächlich $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur

Zunächst sollte die Sekundärstruktur von Claudin-7 betrachtet werden. Das CD-Spektrum von Claudin-7 ist in Abbildung 39 dargestellt.

Das Spektrum weist auf die erwartete hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur mit Anteilen aus  $\beta$ -Faltblättern, welche die Claudin-7 Kopfgruppe bilden hin. Aufgrund diese  $\beta$ -Faltblattanteils konnten nicht die zwei charakteristischen Minima der  $\alpha$ -Helices detektiert werden. Stattdessen wurde ein breites Minimum mit, bei genauerer Betrachtung, zwei lokalen Minima detektiert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Claudin-7 nach der Proteinreinigung über IMAC korrekt gefaltet vorlag.



**Abbildung 39: CD-Spektrum von Claudin-7.**

Dargestellt ist das CD-Spektrum von Claudin-7 in P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM. Das Spektrum deutet auf den erwarteten hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil und die  $\beta$ -Faltblätter der Claudin-7-Kopfgruppe hin.

#### 4.3.3.2 Claudin-7 besitzt eine hohe thermische Stabilität

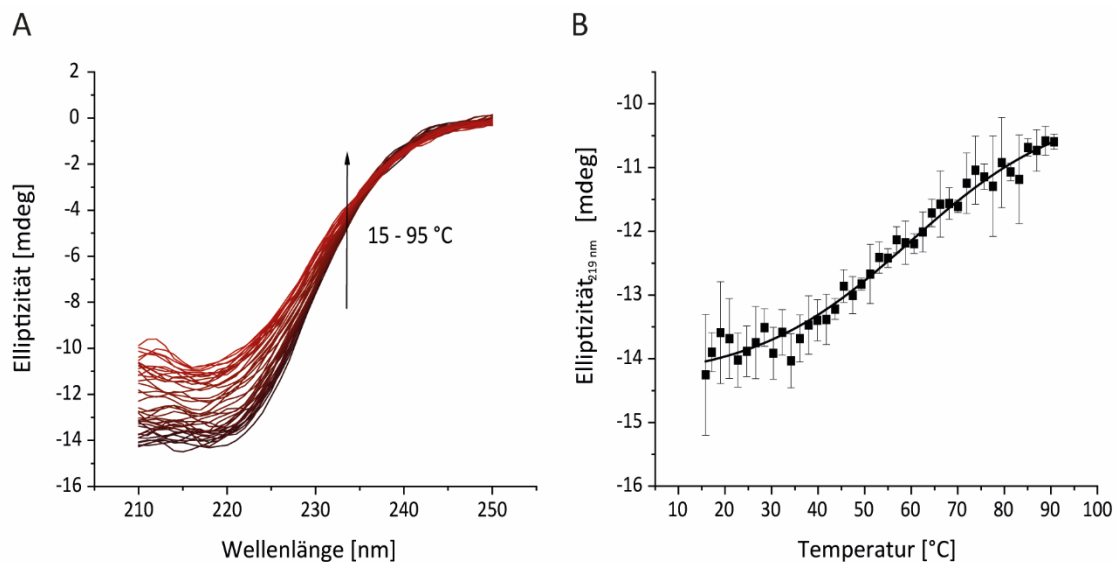
Mittels CD-Spektroskopie kann die Veränderung der Sekundärstruktur bei ansteigenden Temperaturen verfolgt werden. Somit können Rückschlüsse über die thermische Stabilität eines Proteins geschlossen werden. Dabei wurde die Denaturierung von Claudin-7 über die Elliptizität bei 219 nm verfolgt, da das CD-Spektrum hier ein lokales Minimum aufweist.

In Abbildung 40 A sind die CD-Spektren bei steigender Temperatur abgebildet. Dabei wurde das CD-Spektrum bei 15 °C in Schwarz dargestellt, das bei 95 °C in Rot. Es konnte festgestellt werden, dass auch bei einer Temperatur von 95 °C noch eine  $\alpha$ -helikale Struktur vorhanden ist. Claudin-7 wurde also nicht vollständig entfaltet.

In Abbildung 40 B ist die Betrachtung des Minimums bei 219 nm in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Die Kurve weist einen flachen, annähernd sigmoidalen Verlauf auf. Allerdings fehlen die charakteristischen Plateaus am Anfang und Ende der Kurve. Die Elliptizität bei 219 nm steigt zunächst

flacher an, wechselt dann in einen etwas steileren Bereich und flacht gegen Ende wieder ab. Über einen Boltzmann-Fit wurde der Wendepunkt der Kurve bei  $59,7 \text{ °C} \pm 1,5 \text{ °C}$  bestimmt.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Sekundärstruktur von Claudin-7 sehr stabil gegenüber thermischen Einflüssen ist.



**Abbildung 40: Thermische Denaturierung von Claudin-7.**

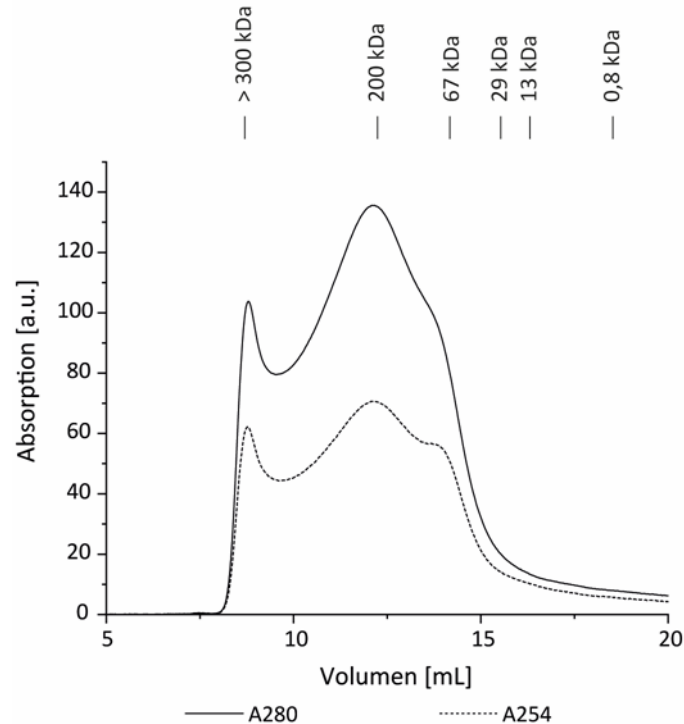
(A) Dargestellt ist der Einfluss einer Temperaturerhöhung von  $15 \text{ °C}$  auf  $95 \text{ °C}$  auf das CD-Spektrum von Claudin-7. Dabei konnte festgestellt werden, dass es nur zu einer geringfügigen Entfaltung von Claudin-7 kommt. Auch bei  $95 \text{ °C}$  konnte noch die Mischung aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt detektiert werden. Lediglich die Intensität hat abgenommen. (B) Hier ist der Verlauf der Elliptizität bei  $219 \text{ nm}$  in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung). Der Verlauf ist abgeflacht sigmoidal. Die Kurve besitzt einen Wendepunkt bei  $59,7 \text{ °C} \pm 1,5 \text{ °C}$ .

#### 4.3.4 GPC zur Bestimmung der Oligomergröße von Claudin-7

Die Oligomerisierung von Claudin-7 ist für die Ausbildung von *tight junctions* wichtig [187]. Bereits während der Proteinreinigung über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelat chromatography*, IMAC) konnte festgestellt werden, dass Claudin-7 Oligomere ausbildet. Diese scheinen sehr stabil zu sein, da eine Detektion in der SDS-PAGE-Analyse in Gegenwart von SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: *Sodium dodecyl sulfate*) erfolgte. Zur genaueren Analyse dieser Oligomere wurde nach erfolgter Proteinreinigung eine analytische Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt (siehe Kap. 3.3.11).

#### 4.3.4.1 Claudin-7 liegt in DDM-Mizellen als Monomer, Hexamer und in höheren Oligomeren vor

Für eine Analyse mittels GPC wurde die Säule Superose 12 10/300 GL von GE Healthcare verwendet.



**Abbildung 41: Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie von Claudin-7.**

Eine Superose 12 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) wurde mit P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM äquilibriert. Es wurden 0,5 mL Claudin-7 mit einer Konzentration von 33  $\mu$ M für die Größenausschlusschromatographie verwendet. Abgebildet wurde die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und bei 254 nm (gepunktete Linie). Es konnte Claudin-7 als Monomer (Schulter des Peaks bei etwa 14 mL), Hexamer (Hauptpeak bei 12,5 mL) und weitere höhere Oligomere (Ausschlussvolumen bei 8 mL) detektiert werden.

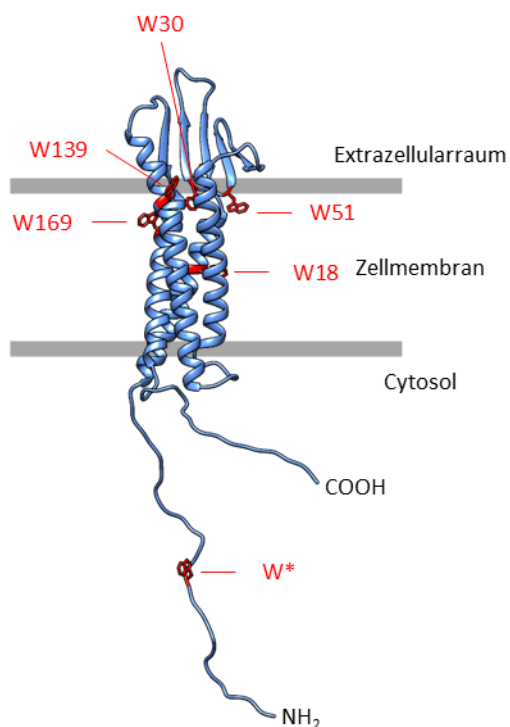
Das Chromatogramm der GPC ist in Abbildung 41 dargestellt. Eine Kalibrierung der Superose 12 10/300 GL-Säule wurde in P-Puffer mit 5 mM N-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM) durchgeführt (Anhang Abbildung 85). Die korrespondierenden molekularen Massen wurden über dem Chromatogramm eingefügt. Das Claudin-7 Monomer besitzt eine molekulare Masse von 26 kDa. Eine DDM-Mizelle hat eine molekulare Masse 40 – 76 kDa [188]. Ein Monomer von Claudin-7 besitzt also eine molekulare Masse von 66 – 102 kDa je nach Größe der DDM-Mizelle. Dieses Monomer konnte mit einem Volumen von 14 mL von der Säule eluiert werden und entspricht einer molekularen Masse von etwa 67 kDa (Albumin, s. Anhang Abbildung 85 C). Des Weiteren konnte hexameres Claudin-7 (6 x 26 kDa + 40 kDa DDM Mizelle = 200 kDa) von der Säule eluiert werden. Dieses wurde nach 12 mL eluiert und entspricht in seiner molekularen Masse in etwa der  $\beta$ -Amylase mit 200 kDa (s. Anhang Abbildung 85 B). Höhere Oligomere von Claudin-7 konnten ebenfalls beobachtet werden. Allerdings konnten diese unter Verwendung der Säule Superose 12 10/300 GL nicht aufgetrennt werden und wurden deshalb im Ausschlussvolumen (Blue Dextran, s. Anhang Abbildung

85 A) detektiert. Aufgrund dessen kann über die molekulare Masse dieser höheren Oligomere keine Aussage getroffen werden.

Laut der vorliegenden Ergebnisse liegt Claudin-7 in DDM-Mizellen als Monomer, Hexamer und in höheren Oligomeren vor.

#### 4.3.5 SDS induzierte Entfaltung von Claudin-7

Claudin-7 bildet wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben Oligomere aus. Um die Stabilität dieser Oligomere und somit der Claudin-7 Quartär-, Tertiär- und eventuell auch Sekundärstruktur zu untersuchen, wurde der Einfluss von SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: *Sodium dodecyl sulfate*) mittels einer SDS-Titration (siehe Kap. 3.3.12) untersucht. Definitionsgemäß handelt es sich hierbei nicht um eine echte Titration [189], da SDS nicht in einem Ansatz sukzessive erhöht wurde, sondern verschiedene Ansätze mit unterschiedlicher SDS-Konzentration hergestellt wurden.



**Abbildung 42: Strukturmodell von Claudin-7 mit Fokus auf die Tryptophan-Seitenketten.**

Abgebildet wurde die Claudin-7 Struktur, welche mittels RaptorX [1] auf Basis der mClaudin-15-Kristallstruktur (PDB-ID 4P79) modelliert wurde. Claudin-7 besitzt fünf Tryptophane (rot hervorgehoben), dazu kommt noch das Tryptophan aus dem *Strep*-Tag II, welches zur Reinigung genutzt werden kann.

Um den Einfluss von SDS auf Claudin-7 zu analysieren, wurde ausgenutzt, dass Tryptophan sein Fluoreszenzspektrum verändert, wenn sich die Polarität der Umgebung ändert. Die vorhergesagte Struktur von Claudin-7 mit in Rot hervorgehobenen Tryptophanen ist in Abbildung 42 zu sehen. Claudin-7 besitzt fünf Tryptophane. Hinzu kommt noch ein sechstes Tryptophan ( $W^*$ ), welches eine Aminosäure des *Strep*-Tag II ist, welcher zur Reinigung verwendet werden kann. Somit stehen für die Betrachtung der Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz sechs Tryptophane zur Verfügung. Das Tryptophan des *Strep*-Tag II befindet sich am N-terminalen cytosolischen Abschnitt des rekombinanten Claudin-7. Es ist somit einer hydrophilen Umgebung exponiert. Die fünf Tryptophan-Seitenketten des Claudin-7 befinden sich hingegen alle in der Membran, bzw. dem Grenzbereich der Membran.

W18 befindet sich etwa in der Mitte der Lipid-

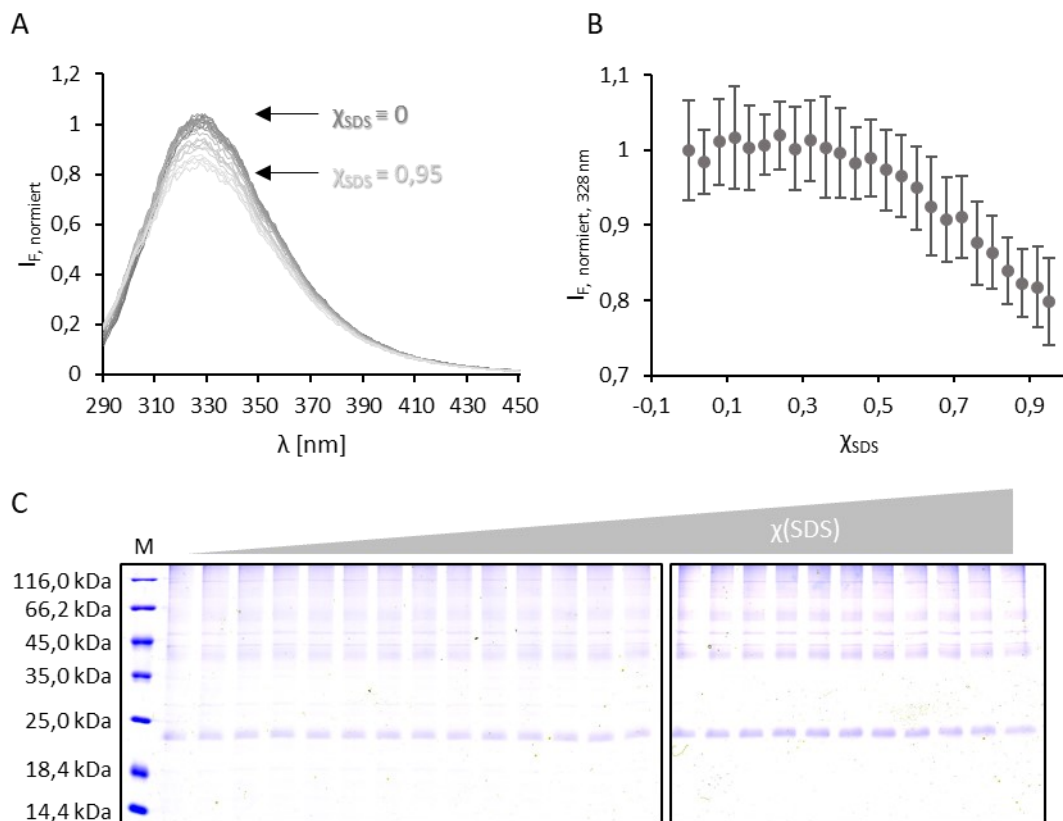
Doppelschicht und somit im hydrophoben Kern der Membran. Die Tryptophan-Seitenketten 30, 51, 139 und 169 befinden sich dagegen näher an den Kopfgruppen der Lipide. Sie befinden sich im

Übergangsbereich der Transmembranhelices und der extrazellulären  $\beta$ -Faltblatt Kopfgruppe und somit zwischen dem hydrophoben Membrankern und den hydrophilen Lipidkopfgruppen.

Zur Analyse des Einflusses von SDS auf Claudin-7 wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt. Des Weiteren wurden SDS-PAGE-Analysen der Proben mit unterschiedlicher SDS-Konzentration der Claudin-7-Oligomere durchgeführt.

#### 4.3.5.1 SDS hat einen Einfluss auf die Tryptophan-Umgebung von Claudin-7, jedoch nicht auf die Oligomerbildung

Die Oligomerisierung von Claudin-7 in Gegenwart von SDS wurde fluoreszenzspektroskopisch und mittels SDS-PAGE-Analyse verfolgt.



**Abbildung 43: Einfluss von SDS auf die Tryptophan-Fluoreszenz von Claudin-7, sowie auf die Oligomerbildung.**

(A) Emissionsspektrum von Claudin-7 bei steigendem Molenbruch  $\chi(\text{SDS})$ . Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Ein Emissionsmaximum konnte bei 328 nm detektiert werden. Die Intensität der Emission nimmt mit steigendem  $\chi(\text{SDS})$  ab. Die dunkelgraue Linie beschreibt dabei den Zustand ohne SDS ( $\chi(\text{SDS}) = 0$ ), während die hellgraue Linie das Emissionsspektrum bei maximaler SDS-Konzentration ( $\chi(\text{SDS}) = 0,95$ ) darstellt. Die Fluoreszenzintensität wurde auf das Maximum bei 328 nm mit  $\chi(\text{SDS}) = 0$  normiert. Es kommt zu einer hypsochromen Verschiebung des Intensitätsmaximums. (B) Verlauf des Intensitätsmaximums bei 328 nm und steigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Dabei scheint zunächst keine Veränderung des Intensitätsmaximums vorzuliegen, ab einem  $\chi(\text{SDS})$  von etwa 0,5 beginnt der Abfall der Intensität scheinbar linear ( $n = 9 \pm \text{Standardabweichung}$ ). (C) SDS-PAGE-Analyse der Claudin-7 Proben mit ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Diese Proben wurden in einem 12 %igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es konnte kein Unterschied im Bandenmuster von Claudin-7 bei steigendem  $\chi(\text{SDS})$  beobachtet werden. Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.

Abbildung 43 A stellt die Veränderung des Tryptophan-Emissionsspektrums bei steigendem  $\chi(\text{SDS})$  dar. Dabei ist ein SDS-Stoffmengenanteil von  $\chi(\text{SDS}) = 0$  in dunkelgrau dargestellt,  $\chi(\text{SDS}) = 0,95$  in hellgrau. Es konnte festgestellt werden, dass sich das Intensitätsmaximum bei 328 nm bis zu einem  $\chi(\text{SDS})$  von 0,4 kaum verändert. Anschließend wurde ein linearer Abfall der Intensität bei 328 nm detektiert, bis die Intensität nur noch etwa 80 % der ursprünglichen Intensität aufweist. Diese würde einer Veränderung der Tryptophan-Umgebung zu einer hydrophileren Umgebung bedeuten. Allerdings ist dieser lineare Abfall bei Membranproteinen nicht unüblich und hat seinen Ursprung in der Wechselwirkung der Tryptophan-Seitenketten mit der Mizellenumgebung [129, 130]. Dieses Phänomen ist für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Membranproteinen hinderlich, da die Entfaltung und somit eine veränderte Tryptophan-Umgebung durch die veränderte Mizellenumgebung überlagert werden kann. Zusätzlich konnte eine leichte Blauverschiebung des Intensitätsmaximums beobachtet werden.

Die seminatale SDS-PAGE-Analyse der Proben der SDS-Titration ist in Abbildung 43 C abgebildet. Es konnte festgestellt werden, dass sich das Claudin-7-Bandenmuster aus Monomer (26 kDa), Dimer (52 kDa) und höheren Oligomeren bei steigendem SDS Molenbruch nicht verändert. Mittels dieser Methode konnte eine Dissoziation der Oligomere durch SDS nicht nachgewiesen werden. Vermutlich liegt Claudin-7 demnach in sehr stabilen Oligomeren vor.

#### **4.3.5.2 Der Einfluss von SDS führt zu einer Verschiebung des Tryptophan-Spektrums hin zu kleineren Wellenlängen**

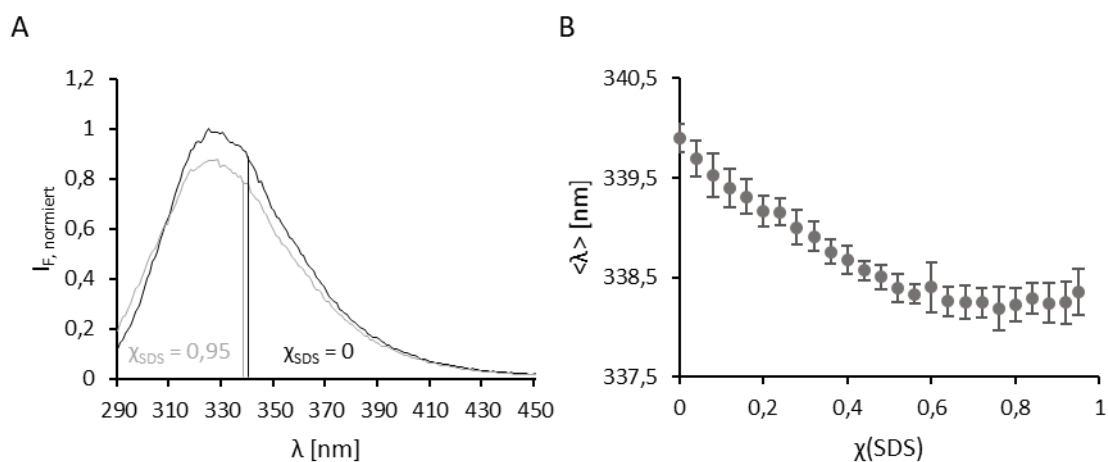
Da die reine Betrachtung des Intensitätsmaximums bei 328 nm Störungen unterlegen ist, wurde in dieser Arbeit auf die Betrachtung der mittleren Wellenlänge  $\langle\lambda\rangle$  zurückgegriffen. Diese bezieht nicht nur die Lage und Intensität des Maximums mit ein, sondern auch die Form des aufgenommenen Spektrums.

Es wurde unter Gleichgewichtsbedingungen gearbeitet. Dazu wurden die Proben vor der Vermessung eine Stunde mit SDS inkubiert. Um auszuschließen, dass sich die mittlere Wellenlänge nach dieser Stunde weiter verändert, wurde eine zeitaufgelöste Messung bei einem SDS-Molenbruch von  $\chi(\text{SDS}) = 0,36$  durchgeführt. Der Verlauf von  $\langle\lambda\rangle$  ist in Abbildung 86 (Anhang) dargestellt. Dabei konnte festgestellt werden, dass  $\langle\lambda\rangle$  sich nach einer Stunde Inkubationszeit nicht mehr verändert. Aufgrund dessen wurden alle Messungen nach einstündiger Inkubation mit SDS durchgeführt.

In Abbildung 44 A sind die Emissionsspektren von Claudin-7 bei maximaler SDS-Konzentration (grau) und ohne SDS (schwarz) abgebildet. Die senkrechte Linie gibt dabei die mittlere Wellenlänge  $\langle\lambda\rangle$  an. Es konnte eine hypsochrome Verschiebung der mittleren Wellenlänge beobachtet werden. Die

mittlere Wellenlänge bei maximaler SDS-Konzentration ist um 2 nm verschoben (von  $\langle \lambda \rangle_{\chi(\text{SDS})=0} = 340 \text{ nm}$  zu  $\langle \lambda \rangle_{\chi(\text{SDS})=0,95} = 338 \text{ nm}$ ). Dies weist auf eine Veränderung der Quartär- und/oder Tertiärstruktur von Claudin-7 hin. Die geringe Verschiebung von 2 nm zeigt, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen keine vollständige Entfaltung von Claudin-7 erfolgt ist.

Der Verlauf der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  in Abhängigkeit des SDS-Molenbruchs  $\chi(\text{SDS})$  ist in Abbildung 44 B abgebildet. Bis zu einem  $\chi(\text{SDS})$  von 0,6 kommt es zu einem Abfall von  $\langle \lambda \rangle$ . Die Tryptophane wurden also in eine potenziell hydrophobere Umgebung exponiert. Ab diesem Punkt konnte eine Erhöhung der SDS-Konzentration keine Veränderung in der mittleren Wellenlänge bewirken.



**Abbildung 44: Analyse der Entfaltung von Claudin-7 über die mittlere Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$ .**

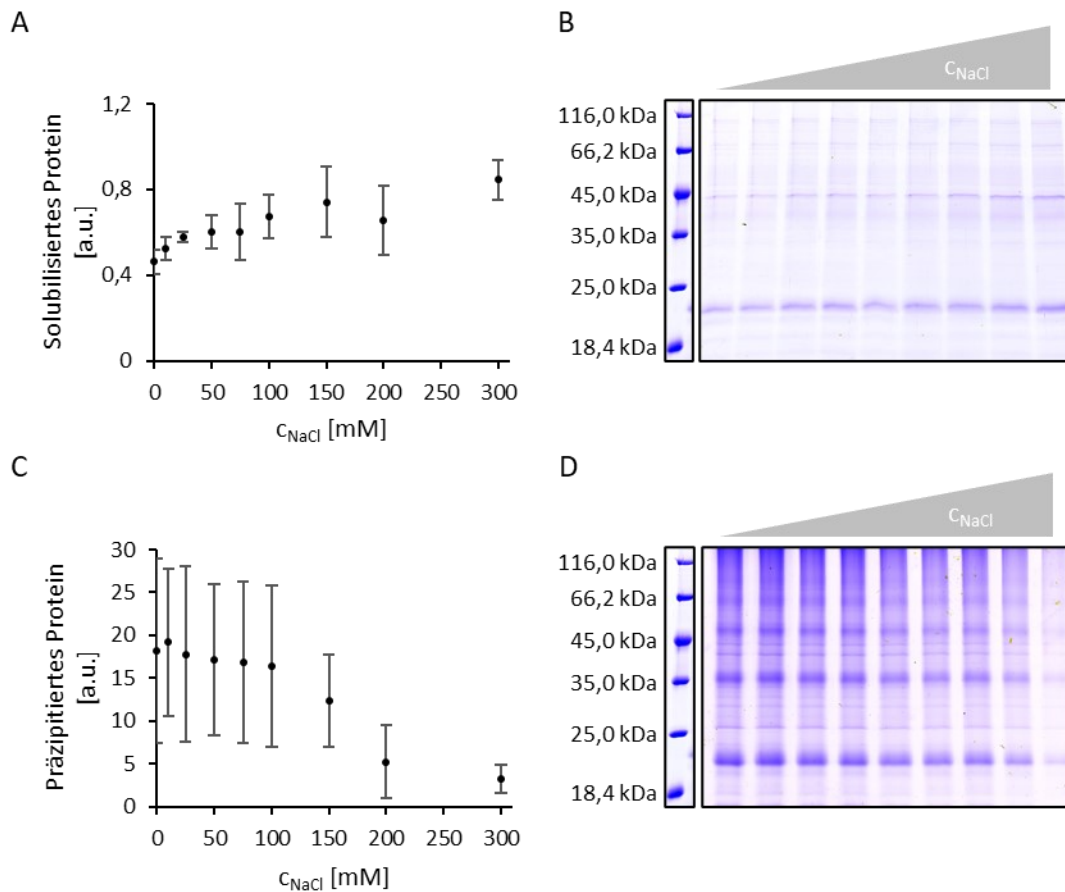
(A) Emissionsspektrum von Claudin-7 bei  $\chi(\text{SDS}) = 0$  (schwarz) und  $\chi(\text{SDS}) = 0,95$  (grau). Die senkrechten Linien geben die mittlere Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  an, bei der die Fläche unter dem Spektrum halbiert wird. Es findet eine hypsochrome Verschiebung von  $\langle \lambda \rangle_{\chi(\text{SDS})=0} = 340 \text{ nm}$  zu  $\langle \lambda \rangle_{\chi(\text{SDS})=0,95} = 338 \text{ nm}$  statt. (B) Verlauf der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  von Claudin-7 bei ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Die mittlere Wellenlänge nimmt dabei bis zu einem  $\chi(\text{SDS})$  von 0,6 ab und bleibt dann konstant. Die Tryptophane werden in eine hydrophobere Umgebung exponiert ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung).

Es konnte gezeigt werden, dass die Struktur von Claudin-7 sehr stabil gegenüber SDS ist und auch Oligomere nicht voneinander getrennt werden.

#### 4.3.6 Elektrostatische Wechselwirkungen führen zur Cluster-Bildung von Claudin-7

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Seitenketten von Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Proteinen oder der Struktur des Proteins [190]. Durch eine erhöhte Ionenstärke können diese Wechselwirkungen gestört oder sogar aufgehoben werden [191]. Im Folgenden sollte der Einfluss von elektrostatischen Wechselwirkungen auf Claudin-7 untersucht werden. Dazu wurde Claudin-7 in unterschiedlichen Puffern analysiert. Das Glycerol wurde entfernt (Puffer S2: 50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, pH 8), um den Einfluss des Natriumchlorids und

somit der Ionenstärke betrachten zu können. Die weiteren Puffer S3-S9 hatten unterschiedliche, geringer werdende NaCl-Konzentrationen (200 mM bis 5 mM NaCl). Zuletzt enthielt der Puffer S10 kein NaCl. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation von solubilisiertem Protein getrennt. Anschließend wurden von Pellet und Überstand Proben genommen und diese einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Diese wurde dann genutzt um mit dem Programm *ImageJ* [128] eine Analyse der Monomerbande von Claudin-7 durchzuführen.



**Abbildung 45: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Claudin-7.**

Es wurde eine Proteinreinigung mittels IMAC in P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM durchgeführt. Das erhaltene Eluat wurde aufgeteilt und in die Puffer S1-S10 dialysiert. S1 entspricht dabei dem Reinigungspuffer, S2 besitzt kein Glycerol, die Puffer S3 bis S9 besitzen eine sinkende NaCl-Konzentration (200 mM, 150 mM, 100 mM, 75 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM). Puffer S10 enthält nur noch 50 mM Phosphat, pH 8. (A) Anteil an solubilisiertem Claudin-7 in Abhängigkeit der Salzkonzentration. Die erhaltenen Werte stammen aus der *ImageJ*-Auswertung [128] der Claudin-7 Monomerbande einer SDS-PAGE-Analyse des zentrifugierten Überstandes nach der Dialyse in den entsprechenden Puffern. Diese SDS-PAGE Analyse ist in (B) abgebildet. Dabei wurde die Probe der Dialyse in S1/Reinigungspuffer auf 1 normiert. (C) Analyse despräzipitierten Proteins nach der Dialyse. Hierzu wurde das Pellet der Zentrifugation in Probenpuffer aufgenommen und die SDS-PAGE ebenfalls einer *ImageJ*-Analyse unterzogen. Die SDS-PAGE des präzipitierten Claudin-7 ist in (D) abgebildet. Die Proben wurden in einem 12 %igen Acrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Aufgetragen wurden 10 µL der genommenen Probe nach der Dialyse. Es wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. (A), (C) n = 3 ± Standardabweichung, (B), (D) repräsentative Acrylamidgele.

In Abbildung 45 ist der Einfluss von NaCl auf Claudin-7 abgebildet. Abbildung 45 B stellt ein repräsentatives Acrylamidgel der Überstände und somit des solubilisierten Proteins dar. Dies zeigt, dass bei geringerer Salz-Konzentration auch geringere Mengen an Claudin-7 vorliegen. Die Auswertung

von drei unabhängigen Versuchen mit *ImageJ* [128] bestätigen dies (Abbildung 45 A). Ist kein NaCl im Puffer enthalten, so lag nur noch weniger als die Hälfte des Claudin-7 in Lösung vor. Bei Erhöhung der Salzkonzentration lag sukzessive mehr Protein solubilisiert vor.

Durch die Betrachtung des präzipitierten Proteins (Abbildung 45 C und D) wird diese Aussage bestätigt. Hier wurde deutlich mehr Claudin-7 detektiert, wenn kein Salz im Puffer enthalten war. Im Kontrast dazu konnte bei 300 mM NaCl kaum präzipitiertes Claudin-7 detektiert werden. Bei der Analyse des präzipitierten Proteins wurden im Vergleich zum solubilisierten Protein ein großer Fehlerbereich detektiert. Folglich wurde im Folgenden das solubilierte Protein betrachtet.

Ist kein Salz im Puffer vorhanden, kommt es nach den vorliegenden Ergebnissen zur Cluster-Bildung zwischen den Claudin-Proteinen, was in einer Präzipitation resultiert. Ist dagegen ausreichend Salz im Puffer vorhanden, werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Claudin-Molekülen gestört und Claudin-7 verbleibt in Lösung. Elektrostatische Wechselwirkungen scheinen somit eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen den Claudin-Proteinen zu spielen.

#### **4.3.7 Claudin-7 bildet Kopf-zu-Kopf Interaktion in Proteoliposomen aus**

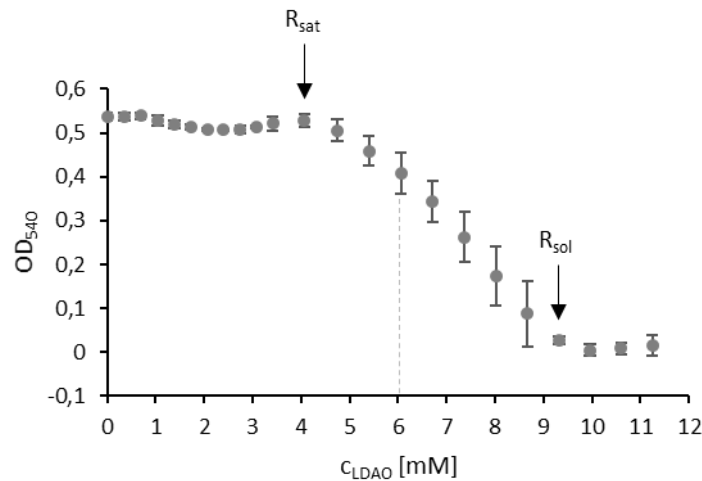
Um Claudin-7 in einer natürlicheren Umgebung als Detergenzmizellen zu untersuchen, sollte Claudin-7 in Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen rekonstituiert werden. *In vivo* bilden Claudin-Proteine über die Interaktion der extrazellulären  $\beta$ -Faltblatt-Domäne Zellverknüpfungen (*tight junctions*) aus. Diese Kopf-zu-Kopf Interaktion sollte über einen Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Assay untersucht werden. Dafür wurde Claudin-7 in unterschiedlich markierten Liposomen rekonstituiert. Zunächst sollten die geeigneten Bedingungen für eine Rekonstitution von Claudin-7 gefunden werden.

##### **4.3.7.1 DOPC-Liposomen können mit 6 mM LDAO destabilisiert werden**

Eine Möglichkeit, um Membranproteine in Liposomen zu rekonstituieren, ist die Rekonstitution von in Detergenz solubilisiertem Membranprotein in destabilisierte Liposomen. Diese Methode ist sehr schonend [137, 192]. Es sollte ermittelt werden, bei welcher Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO)-Konzentration DOPC-Liposomen destabilisiert vorliegen und somit eine Integration von Claudin-7 in die Liposomen möglich ist.

Dazu wurden DOPC-Liposomen mit einer LDAO-Stammlösung titriert. Die Stabilität der Liposomen wurde über die optische Dichte bei 540 nm (Streuung der Liposomen) verfolgt.

Die Stabilität von DOPC-Liposomen gegenüber LDAO ist in Abbildung 46 dargestellt. Sind die Liposomen intakt, weisen sie eine Absorption bei 540 nm auf. Dies konnte für DOPC-Liposomen beobachtet werden. Bei etwa 4,5 mM LDAO wurde eine Sättigung der DOPC-Liposomen mit LDAO beobachtet ( $R_{\text{sat}}$ ). Anschließend fällt die Absorption bei 540 nm ab, bis die Liposomen vollständig in LDAO solubilisiert wurden. Dieser Punkt ( $R_{\text{sol}}$ ) wurde bei einer LDAO-Konzentration von etwa 9 mM erreicht. Bei Konzentrationen zwischen  $R_{\text{sat}}$  und  $R_{\text{sol}}$  liegen die Liposomen in einer destabilisierten Form vor.



**Abbildung 46: Stabilität von DOPC-Liposomen gegenüber steigender LDAO-Konzentration.**

Die Stabilität der DOPC-Liposomen (1,5 mg/mL, 2 mM) wurde über die  $OD_{540}$  verfolgt.  $R_{\text{sat}}$  bezeichnet dabei die Konzentration von LDAO (ca. 4,5 mM), bei der die DOPC-Liposomen vollständig mit LDAO gesättigt sind.  $R_{\text{sol}}$  bezeichnet den Punkt, an dem die DOPC-Liposomen vollständig in der LDAO-Lösung solubilisiert wurden (ca. 9 mM LDAO). Zwischen diesen beiden Punkten liegen die Liposomen in einem destabilisierten Zustand vor, der für die Rekonstitution von Membranproteinen nötig ist. Bei 6 mM LDAO (gestrichelte Linie) sind die Liposomen bereits destabilisiert und können deswegen zur Rekonstitution von Claudin-7 genutzt werden.

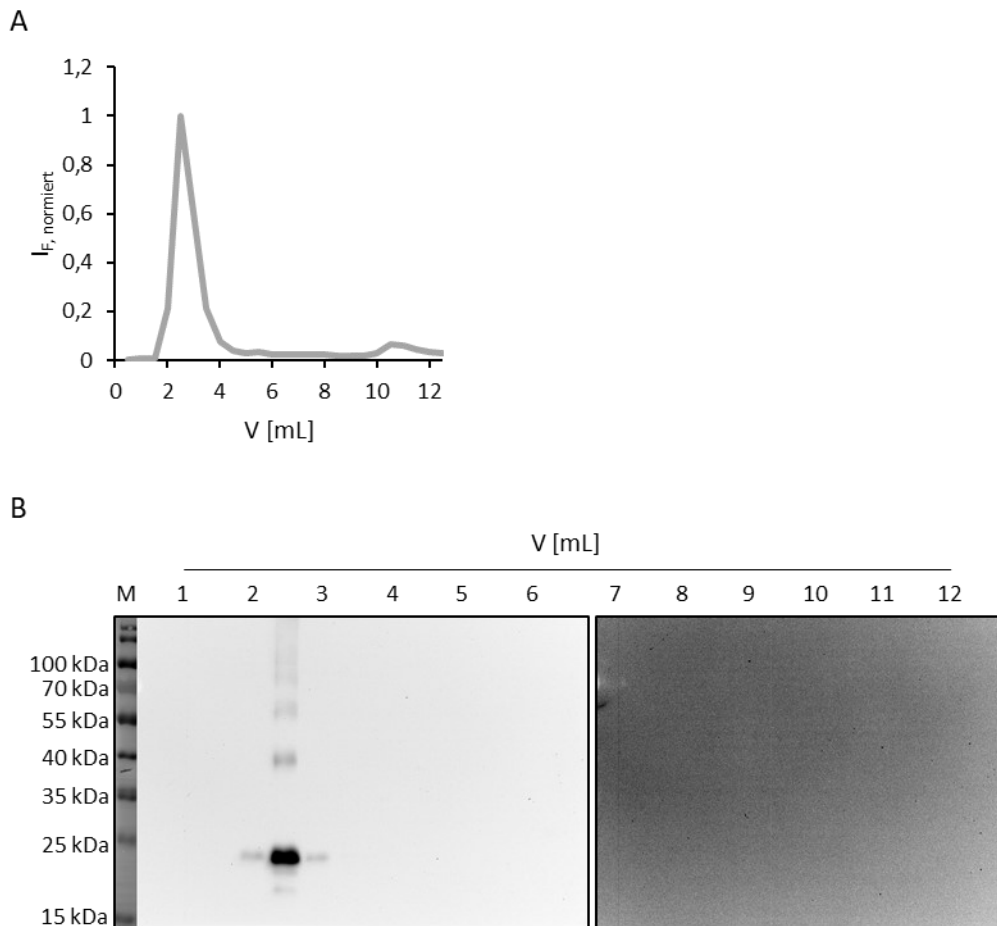
Für eine Rekonstitution von Claudin-7 wurde eine LDAO Konzentration von 6 mM verwendet, da hier bereits destabilisierte Liposomen vorliegen.

#### 4.3.7.2 Claudin-7 kann erfolgreich in DOPC-Liposomen rekonstituiert werden

Nachdem die Konzentration zur Destabilisierung der DOPC-Liposomen ermittelt wurde, sollte nun eine Rekonstitution von Claudin-7 erfolgen. Über einen Saccharose-Gradienten (siehe Kap. 3.3.17) wurde das Ergebnis der Rekonstitution überprüft.

Die Analyse des Saccharose-Gradienten ist in Abbildung 47 dargestellt. In Abschnitt A wurde die LissRhod-PE-Fluoreszenz der einzelnen Fraktionen des Saccharose-Gradienten analysiert. Diese zeigt die Lokalisation der Liposomen an. Die Liposomen konnten in den Fraktionen von 2 mL bis 3,5 mL detektiert werden. Dies entspricht genau der Grenzschicht zwischen P-Puffer (Tabelle 1) und der

40 %igen Saccharose (w/v, in P-Puffer). Die Lokalisation von Claudin-7 wurde durch eine Western Blot-Analyse der Fraktionen des Saccharose-Gradienten ermittelt. Diese ist in Abbildung 47 B dargestellt. Claudin-7 konnte hauptsächlich in der Fraktion von 2,5 mL detektiert werden. Auch in der 2 mL und 3 mL Fraktion konnten geringe Mengen von Claudin-7 detektiert werden. Somit konnte Claudin-7 in denselben Fraktionen detektiert werden, in denen sich auch die Liposomen befanden. Die Rekonstitution von Claudin-7 in DOPC-Liposomen war demnach erfolgreich.



**Abbildung 47: Analyse der rekonstituierten Liposomen mittels Fluoreszenzspektroskopie und Western Blot.**

Zur Trennung der Liposomen und aggregiertem Protein wurde die Probe in einem Saccharose-Gradienten getrennt. Die Liposomen wurden mit LissRhod-PE markiert, um die Liposomen-Fraktion im Fluorimeter detektieren zu können. (A) Analyse der Fraktionen des Saccharose-Gradienten mittels Fluoreszenzspektroskopie. (B) Western Blot-Analyse der Fraktionen des Saccharose-Gradienten. Es wurden je 10  $\mu$ L der TCA gefällten Proben auf ein 12 %iges Acrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Als Marker wurden 5  $\mu$ L PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

Um zu überprüfen, ob das Detergenz vollständig aus den Proteoliposomen entfernt werden konnte, wurde eine Dünnschichtchromatographie der Ansätze vor und nach der Dialyse durchgeführt. Diese ist in Abbildung 87 im Anhang einzusehen. Es konnte festgestellt werden, dass durch die Dialyse sämtliches LDAO aus dem Reaktionsansatz entfernt wurde.

#### 4.3.7.3 Claudin-7 verknüpft *in vitro* Liposomen

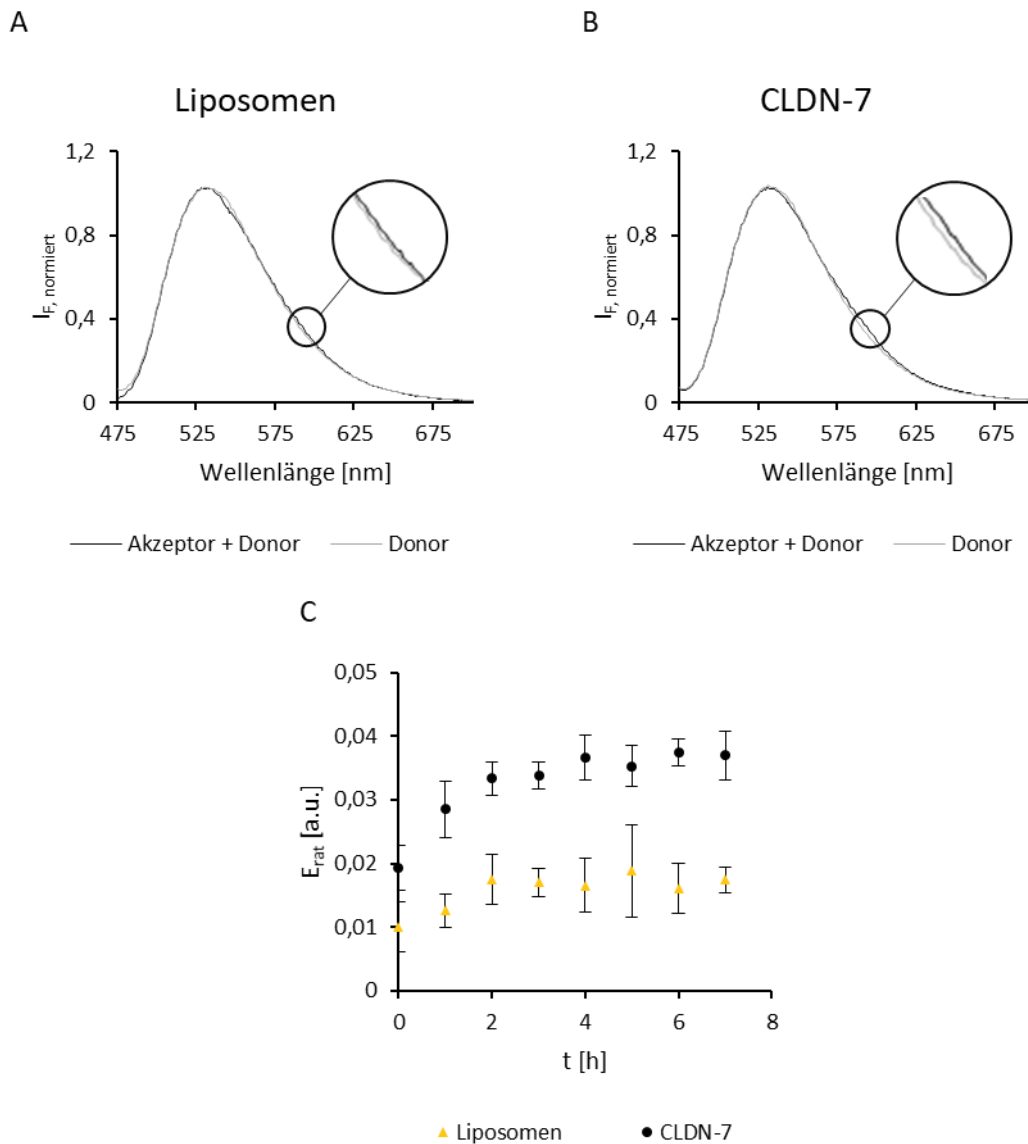
Da Claudin-7 erfolgreich in DOPC-Liposomen rekonstituiert werden konnte, sollte im Folgenden die Interaktion der  $\beta$ -Faltblatt-Kopfgruppen über einen FRET-Assay betrachtet werden. Ein Schema des FRET-Assays ist in Abbildung 14 dargestellt (siehe Kap. 3.5.2). Es wurden zwei Arten von Proteoliposomen hergestellt: Zum einen Proteoliposomen, welche mit 18:1 NBD-PE markiert waren und zum anderen Proteoliposomen, welche mit 18:1 LissRhod-PE markiert waren. Dabei diente NBD-PE als FRET-Donor, LissRhod-PE als FRET-Akzeptor. Die Zellverknüpfung durch *tight junctions* wird über die Interaktion der extrazellulären  $\beta$ -Faltblatt-Domäne ausgebildet. Interagieren die Claudin-7 Kopfgruppen, so kommt ein Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor zustande und Akzeptor-Fluoreszenz kann detektiert werden. Als Kontrolle dienen markierte Liposomen ohne Claudin-7, welche jedoch nach demselben Prinzip wie die Proteoliposomen hergestellt wurden.

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse des FRET-Assays für Claudin-7 zusammengefasst. In Abschnitt A wurde das reine NBD-PE-Spektrum (grau) der Liposomen gegenüber dem Spektrum der Mischung der unterschiedlich markierten Liposomen (schwarz) aufgetragen. Bei genauerer Betrachtung konnte wie erwartet kein Unterschied in den beiden Spektren erkannt werden. Die Liposomen sollten nicht miteinander interagieren und aus diesem Grund sollte auch kein FRET-Signal detektiert werden. Abschnitt B zeigt die Spektren für Proteoliposomen. Hier konnte ein Unterschied zwischen dem NBD-PE-Ansatz und dem Ansatz der gemischten, unterschiedlich markierten Proteoliposomen beobachtet werden. Dieser Unterschied ist erwartungsgemäß gering, da nur die fluoreszenzmarkierten Lipide in der Nähe von Claudin-7 ein FRET-Paar ausbilden können. Aufgrund dessen wurde die ratiometrische FRET-Effizienz  $E_{\text{rat}}$  (Formel (7), Kap. 3.5.2) berechnet. Damit konnte ein Vergleich zwischen Liposomen und Proteoliposomen ermöglicht werden.

Die zeitaufgelöste ratiometrische FRET-Effizienz für Liposomen und Proteoliposomen ist in Abbildung 48 C abgebildet. Bereits direkt nach dem Mischen der Donor-Proteo-/Liposomen mit den Akzeptor-Proteo-/Liposomen konnten minimale Unterschiede zwischen Liposomen und Proteoliposomen beobachtet werden. Die Proteoliposomen wiesen wie erwartet eine größere ratiometrische FRET-Effizienz auf als die Liposomen. Dies spricht für eine Interaktion der Claudin-7 Kopfgruppen, welche die Proteoliposomen in räumliche Nähe bringen und so einen Energietransfer ermöglichen. Bei längeren Inkubationszeiten steigt die ratiometrische FRET-Effizienz für die Proteoliposomen zunächst deutlich an. Nach etwa zwei Stunden Inkubation flacht dieser Anstieg etwas ab, jedoch konnte auch bei längerer Inkubation noch ein minimaler Anstieg der ratiometrischen FRET-Effizienz beobachtet werden. Auch für die Liposomen konnte bis zu einer Inkubationszeit von zwei Stunden ein Anstieg der ratiometrischen FRET-Effizienz beobachtet werden. Anschließend konnte jedoch keine Veränderung der ratiometrischen FRET-Effizienz mehr beobachtet werden. Das zufällige Aufeinandertreffen von

Liposomen unter Ausbildung eines FRET-Paars hat nach zwei Stunden Inkubation ein Gleichgewicht erreicht und verändert sich dann nicht mehr.

Rekombinantes Claudin-7 vernetzt Proteoliposomen miteinander, sodass ein Energietransfer zwischen einem FRET-Paar detektiert werden konnte. Claudin-7 vernetzt Proteoliposomen analog zur Ausbildung von *tight junctions in vivo*. Somit konnte *in vitro* die Funktionsfähigkeit von Claudin-7 nachgewiesen werden.



**Abbildung 48: Ergebnis des FRET-Assays zur Betrachtung der Kopf-zu-Kopf Interaktion von Claudin-7.**

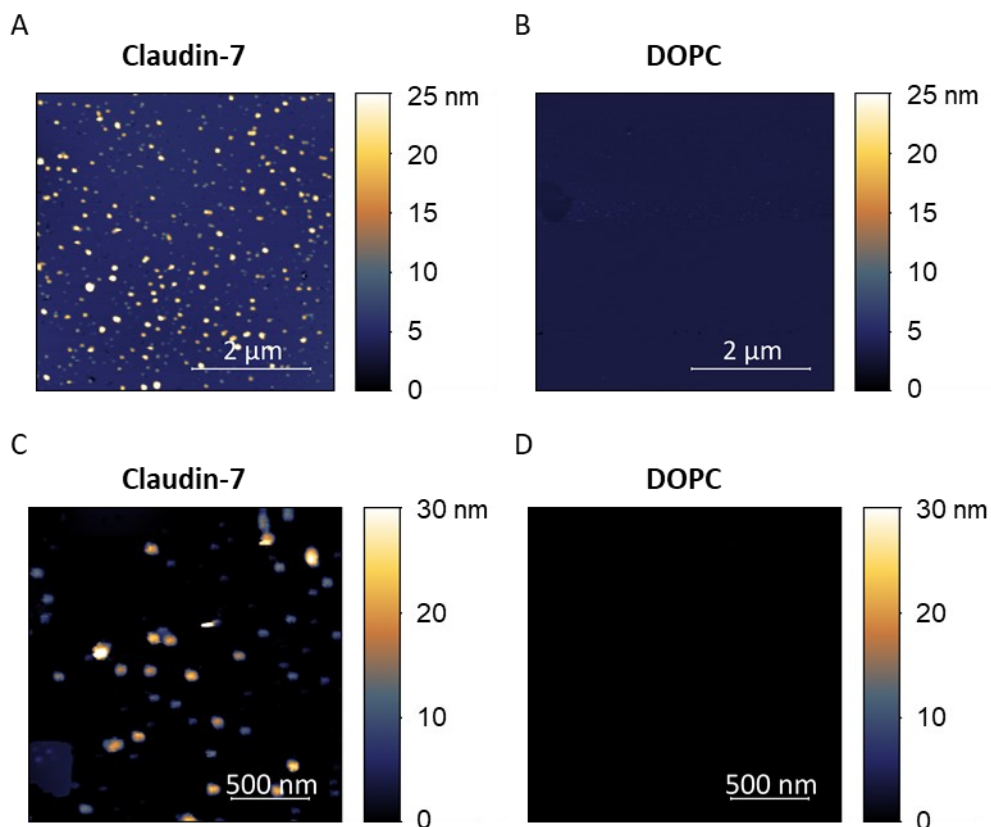
(A) Emissionsspektrum von NBD-PE (Donor), einmal allein (hellgrau) und einmal nach Zugabe des Akzeptors (LissRhod-PE) in Liposomen nach 7 h Inkubation (schwarz). Es konnte kein Unterschied zwischen den Spektren bei 583 nm (Emissionsmaximum von LissRhod-PE) beobachtet werden. (B) Emissionsspektrum von NBD-PE (Donor), einmal allein (hellgrau) und einmal nach Zugabe des Akzeptors (LissRhod-PE) nach 7 h Inkubation in Proteoliposomen (schwarz). Es konnte ein Unterschied zwischen den Spektren bei 583 nm (Emissionsmaximum von LissRhod-PE) beobachtet werden. Zur genaueren Betrachtung wurde die ratiometrische FRET-Effizienz  $E_{rat}$  für Liposomen und Proteoliposomen ermittelt (C). Dabei konnte ein deutlicher Unterschied zwischen Liposomen und Proteoliposomen beobachtet werden ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung). Claudin-7 vernetzt also die NBD-PE-Liposomen mit den LissRhod-PE-Liposomen, wodurch ein FRET-Signal detektiert werden konnte.

### 4.3.8 Rasterkraftmikroskopie (engl.: *Atomic force microscopy, AFM*) von Claudin-7 Membranen

Nachdem die Kopf-zu-Kopf-Interaktion von Claudin-7 *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollte diese nun im nächsten Schritt genauer analysiert werden. Dazu wurden Lipid-Doppelschichten mit Claudin-7 mittels Rasterkraftmikroskopie (engl.: *Atomic force microscopy, AFM*) in Kooperation mit Dr. Benedikt Junglas untersucht. Dies ermöglicht Rückschlüsse über die Claudin-7 Interaktion in der Membran.

#### 4.3.8.1 Claudin-7 Membranen unterscheiden sich deutlich von DOPC Membranen

Zunächst sollte analysiert werden, ob sich die Membranen mit Claudin-7 von reinen Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) Membranen unterscheiden lassen. Dazu wurden die Proteoliposomen und Liposomen hergestellt und anschließend auf Mica-Trägermaterial aufgebracht (siehe Kap. 3.5.4).



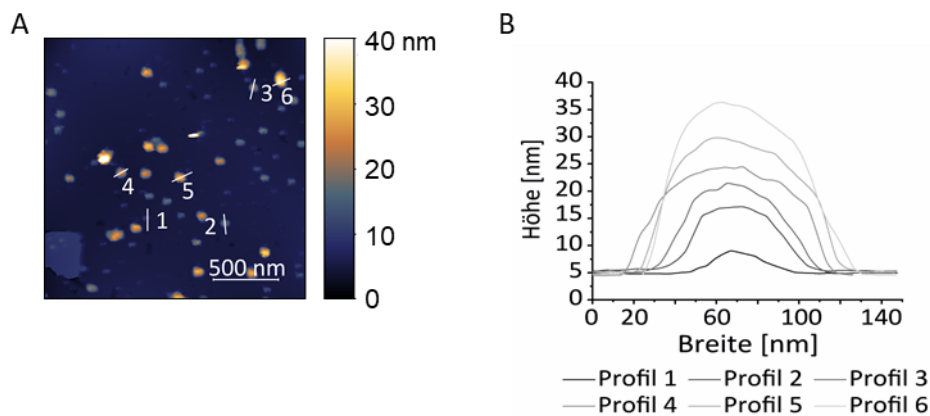
**Abbildung 49: AFM-Aufnahmen von Claudin-7 Membranen und DOPC Membranen.**

AFM-Bilder der an Mica gebundenen Claudin-7 Membranen (A, C) und DOPC Membranen (B, D). Die Ansätze wurden in P-Puffer (Tabelle 1) vermessen. Der Falschfarbenmarker gibt die Höhe der Probe an. Die Bilder wurden mit dem Programm GWYDDION [163] bearbeitet. DOPC Membranen bilden eine flache Lipiddoppelschicht auf dem Mica aus. Bei Claudin-7 Membranen konnten Punkte mit unterschiedlicher Höhe auf der Lipiddoppelschicht detektiert werden.

In Abbildung 49 sind typische AFM Topografie-Aufnahmen von Claudin-7 Membranen und DOPC Membranen abgebildet. Bereits auf den ersten Blick konnten deutliche Unterschiede zwischen Protein enthaltenen Membranen und reinen Membranen erkannt werden. Während die Liposomen auf dem Mica eine flache Membranschicht bilden, wurde für die Proteoliposomen ein wesentlich komplexeres Bild erhalten. Die Aufnahme in Abbildung 49 A zeigt Spots mit unterschiedlicher Höhe. Beim Scannen eines kleineren Bereichs der Probe (Abbildung 49 C) wurde deutlich, dass es Punkte mit unterschiedlicher Höhe und Ausbreitung gibt. Dies soll im Folgenden genauer untersucht werden.

#### 4.3.8.2 Claudin-7 führt zur Vernetzung von Membranen

Die AFM-Aufnahmen wurden mittels des Programms GWYDDION [163] bearbeitet und analysiert.

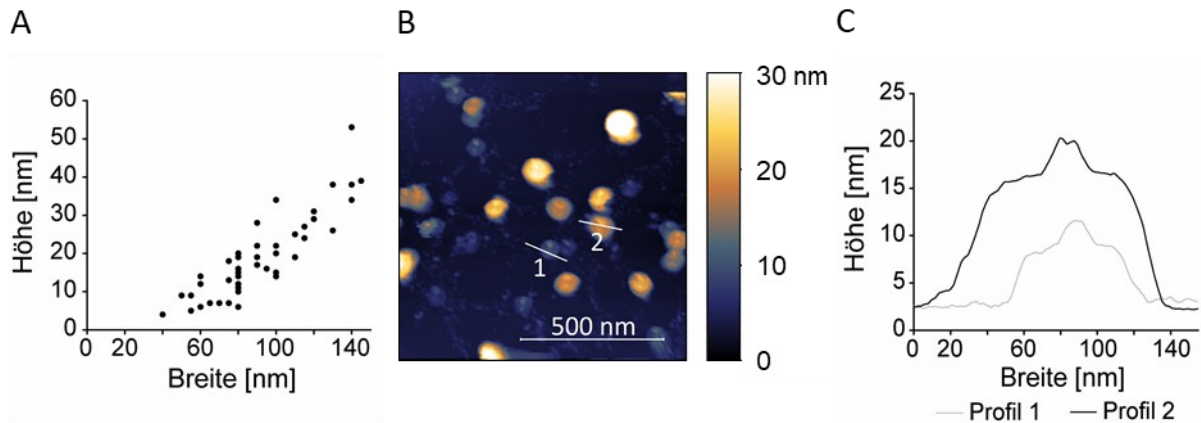


**Abbildung 50: Profil-Analyse der AFM-Aufnahme von Claudin-7 Membranen.**

AFM-Bilder der an Mica gebundenen Claudin-7 Membranen (A) und die Profilanalyse einzelner Punkte (B). Dabei wurde die Profilanalyse rechts des AFM-Bildes abgebildet. Die Position des jeweiligen Profils wurde in der AFM-Aufnahme markiert. Der Ansatz wurde in P-Puffer (Tabelle 1) vermessen. Der Falschfarbenmarker gibt die Höhe der Probe an. Die Bilder und Profile wurden mit dem Programm GWYDDION [163] erstellt. Es konnte festgestellt werden, dass Proteoliposomen aufeinander gespreitet wurden.

In Abbildung 50 ist eine AFM-Aufnahme und ihre Profilanalyse abgebildet. Zunächst konnte festgestellt werden, dass hier eine Lipid-Doppelschicht auf dem Mica gespreitet wurde, da eine Grundhöhe von 5 nm ermittelt wurde (Abbildung 50 B). Dies entspricht einer DOPC-Doppelschicht auf Mica [193]. Die Höhe der detektierten Punkte entspricht einem Vielfachen von etwa 5 nm. Für die AFM-Aufnahme in Abbildung 50 A konnten Profile mit etwa 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm und 35 nm detektiert werden. Die Profile haben eine kuppelförmige Struktur mit abgeflachter Oberfläche. Die detektierten Profile legen die Vermutung nahe, dass sich in den Punkten mehrere Doppelschichten übereinander lagern und sich bis zu sieben auf dem Mica-Trägermaterial gespreitet haben. Ab einer Höhe von 20 nm haben die Punkte eine Breite von etwa 100 nm, der niedrigste Punkt hat eine Breite von etwa 40 nm. Es konnte beobachtet werden, dass die Punkte im Mittel einen Durchmesser von etwa 90 nm besitzen.

Die Verteilung der Breite der Membranstapel ist nicht gleichmäßig. Es konnte eine Korrelation zwischen Höhe und Durchmesser der Punkte beobachtet werden. Bei steigender Höhe steigt auch der Durchmesser an (Abbildung 51 A). Bei einer guten Auflösung der AFM-Aufnahmen konnte eine Feinstruktur der Membranpunkte beobachtet werden. Auf der Oberfläche konnten Erhöhungen von etwa 2-3 nm detektiert werden (Abbildung 51 B, C).



**Abbildung 51: Analyse des Durchmessers und der Feinstruktur der Claudin-7 Membranpunkte.**

(A) Analyse der Claudin-7 Membranpunkte unter Betrachtung der Höhe und des Durchmessers. (B) AFM-Aufnahme der an Mica gebundenen Claudin-7 Membranen. Der Ansatz wurde in P-Puffer (Tabelle 1) vermessen. Der Falschfarbenmarker gibt die Höhe der Probe an. Die Bilder und Profile wurden mit dem Programm GWYDDION [163] erstellt. (C) Profilanalyse zweier Membranpunkte, diese sind in der AFM-Aufnahme (B) markiert. Die Punkte haben eine Feinstruktur (Erhebung auf dem Plateau).

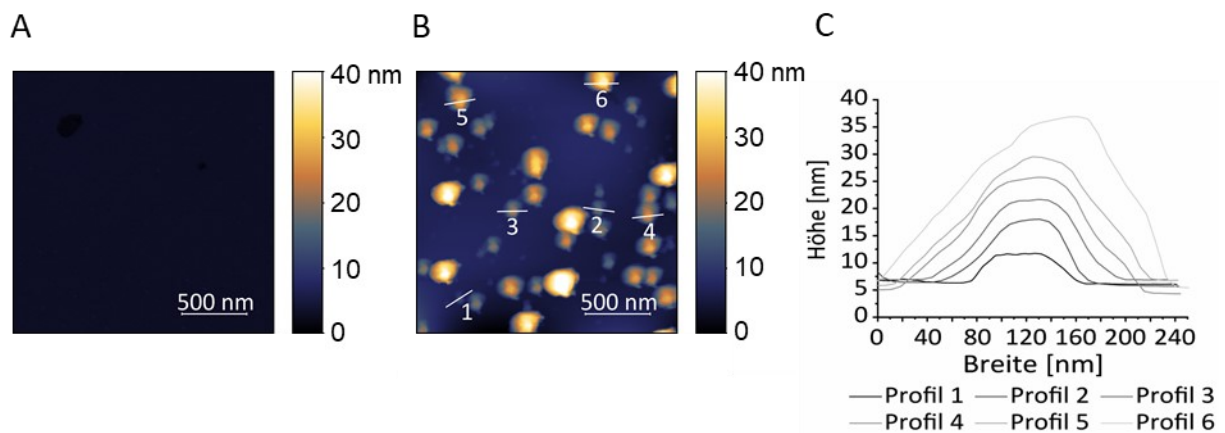
Es konnte festgestellt werden, dass es durch Claudin-7 zu einer Ausbildung von Membranstapeln kommt.

#### 4.3.8.3 Claudin-7 vernetzt auch bei geringer Ionenstärke Membranen

Durch die Modulation der NaCl-Konzentration konnte Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Claudin-7 genommen werden (siehe Kap. 4.3.6). Nun sollte untersucht werden, ob sich durch die Reduktion der Ionenstärke in der Probe eine Veränderung in der Kopfgruppeninteraktion beobachten lässt. Dazu wurden die Membranen in Puffer ohne NaCl untersucht.

In Abbildung 52 sind typische AFM-Aufnahmen abgebildet. Abschnitt A stellt dabei eine Aufnahme der DOPC Membran dar. DOPC-Liposomen spreiten mit und ohne NaCl als Lipiddoppelschicht auf der Mica-Oberfläche. Für Claudin-7 Membranen konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den untersuchten Salzbedingungen festgestellt werden. Die Höhe der Membranstapel weisen keinen Unterschied zu den Membranstapeln mit Salz auf. Es konnte ein geringfügiger Unterschied in dem Durchmesser der Stapel

beobachtet werden. Ohne NaCl wurden etwas breitere Membranstapel beobachtet. Der Durchmesser der Membranstapel nimmt auch ohne NaCl mit steigender Höhe des Membranstapels zu.



**Abbildung 52: AFM-Aufnahmen der Claudin-7 Membranen ohne NaCl.**

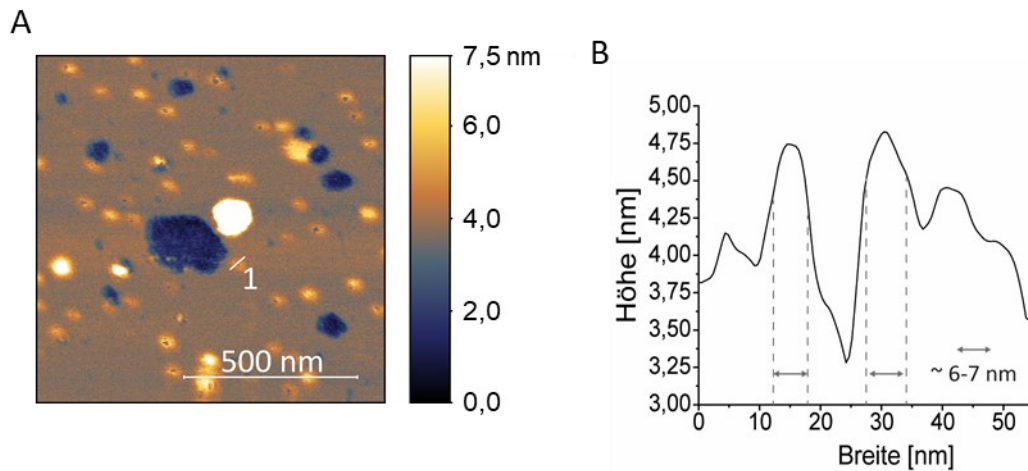
AFM-Bilder der an Mica gebundenen DOPC Membranen (A), Claudin-7 Membranen (B) und die Profilanalyse einzelner Punkte (C). Der Ursprung des jeweiligen Profils wurde in der AFM-Aufnahme markiert. Die Ansätze wurden in S10-Puffer (50 mM Phosphat, pH 8) vermessen. Der Falschfarbenmarker gibt die Höhe der Probe an. Die Bilder und Profile wurden mit dem Programm GWYDDION [163] bearbeitet, bzw. erstellt. DOPC Proteoliposomen bilden eine Lipiddoppelschicht aus, während durch Claudin-7 die Proteoliposomen in Stapeln gespreitet werden.

#### 4.3.8.4 Mittels AFM können Claudin-7-Oligomerringe detektiert werden

Die Feinstruktur auf den detektierten Membranstapeln wurde im Folgenden genauer betrachtet. Durch genauere Auswertung der erhaltenen AFM-Aufnahmen konnten Oligomerstrukturen identifiziert werden.

In Abbildung 53 ist eine AFM-Aufnahme der Claudin-7 Membranen zu sehen, sowie eine Profilanalyse der Feinstruktur auf den Membranen. Die AFM-Aufnahme weist das bekannte Muster aus verschiedenen hohen Spots auf. Jedoch wurde die Skala hier so angepasst, dass nur Objekte mit bis zu 7,5 nm sichtbar sind. Das bedeutet, dass alle Lipidebenen über dem Grundniveau nur als sehr helle Spots sichtbar sind. Das Grundniveau weist eine bläulich gelbe Farbe auf. Auf der Grundebene konnten kleinere kreisförmige Strukturen (gelb) mit einem Durchmesser von 20 – 40 nm detektiert werden. Ein Großteil dieser Feinstrukturen weist eine Vertiefung in der Mitte auf. Die Claudin-7  $\beta$ -Faltblatt-Kopfgruppe besitzt in etwa einen Durchmesser von 3 nm (auf Basis des Strukturmodells mit Chimera [146] bestimmt) und ist somit zu klein, um diese Strukturen zu verursachen. Es liegt nahe, dass oligomeres Claudin-7 detektiert wurde. Die weitere Analyse eines solchen Claudin-7 Oligomer-rings (Abbildung 53 B) ergab, dass die Ringe eine Breite von 6-7 nm aufweisen. Die Genauigkeit der Messung wird durch den Spitzendurchmesser (hier 2 nm) und die Scan Geschwindigkeit ( $\approx 2$  nm/pixel) bestimmt. Somit ist es kaum möglich Objekte exakt abzubilden, die kleiner als 4 nm sind. Die detektierten Ringe könnten

also in Wirklichkeit eine Dicke von 2–10 nm aufweisen, wenn die Scan Geschwindigkeit mit einbezogen wird.



**Abbildung 53: Betrachtung der Claudin-7 Oligomere mittels AFM.**

AFM-Aufnahme der Claudin-7 Membranen (A) mit Profil-Analyse eines Claudin-7 Oligomers (B). Der Ursprung des Profils wurde in der Aufnahme markiert (weißer Strich). Die Ansätze wurden in S10-Puffer (50 mM Phosphat, pH 8) vermessen. Der Falschfarbenmarker gibt die Höhe der Probe an. Das Bild und die Profilanalyse wurden mit dem Programm GWYDDION [163] bearbeitet, bzw. erstellt. Für das Claudin-7 Oligomer konnte eine kreisförmige Anordnung um einen Krater detektiert werden. Dabei wurde für die Kraterwand eine Breite von 6-7 nm ermittelt.

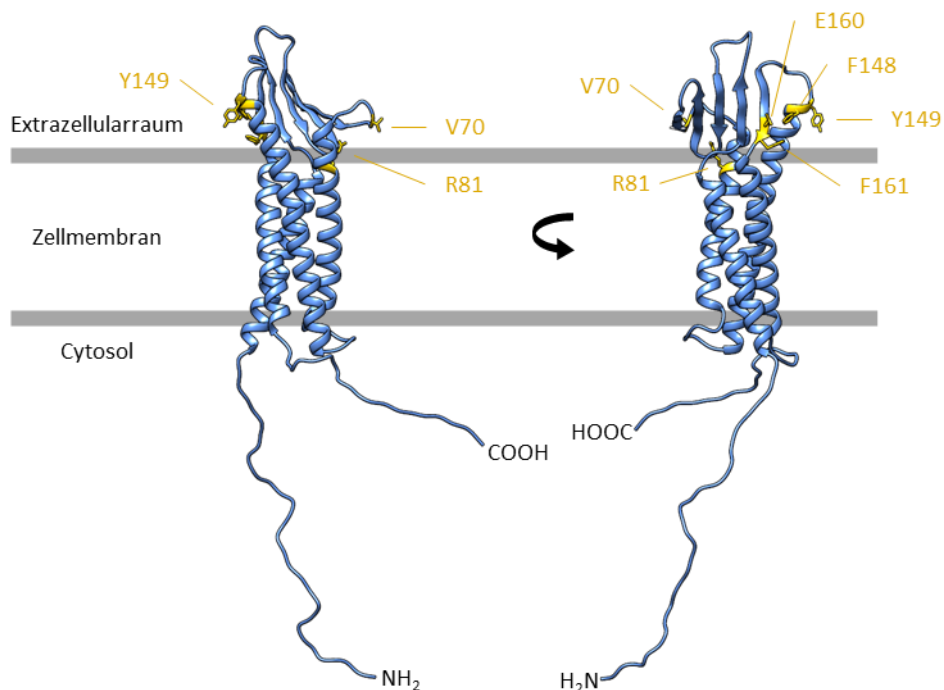
Aus den erhaltenen Aufnahmen konnte geschlossen werden, dass die Claudin-7 Oligomere in Ringform vorliegen.

#### 4.3.9 Mutationen im Interaktionsbereich von Claudin-7

Um genauere Einblicke in die Interaktion zwischen den Claudin-7-Monomeren zu erhalten, wurden sechs Aminosäuren identifiziert, welche für die Interaktion in der Membranebene relevant sein sollen. Diese Reste wurden in der Kristallstruktur von mClaudin-15 als Kontaktstellen im Kristall identifiziert [29].

Suzuki *et al.* konnten in Sf9-Zellen, welche mClaudin-15 exprimieren, durch eine Mutation des Methionin 68 feststellen, dass keine Stränge von *tight junctions* mehr ausgebildet wurden [29]. Diese Aminosäure entspricht in Claudin-7 dem Valin an Position 70. Des Weiteren konnte bei einer Mutation des Paares F146/F147 ebenfalls keine Ausbildung der typischen *tight junction* Stränge beobachtet werden [29]. Diese Aminosäuren entsprechen in Claudin-7 dem Paar F148/Y149. Zusätzlich wurden über die Betrachtung der elektrostatischen Oberfläche, der Claudin-15 Kopfgruppe, die Aminosäuren R79, E157 und L158 als relevant für die Interaktion identifiziert [29]. Dabei bildet sich auf der einen Seite mit M68 und R79 und auf der anderen Seite mit F146, F149, E157 und L158 ein komplementärer

Bereich mit passender Tasche aus. Diese zusätzlichen Aminosäuren entsprechen den Aminosäuren Arginin 81, Glutaminsäure 160 und Phenylalanin 161 in Claudin-7.



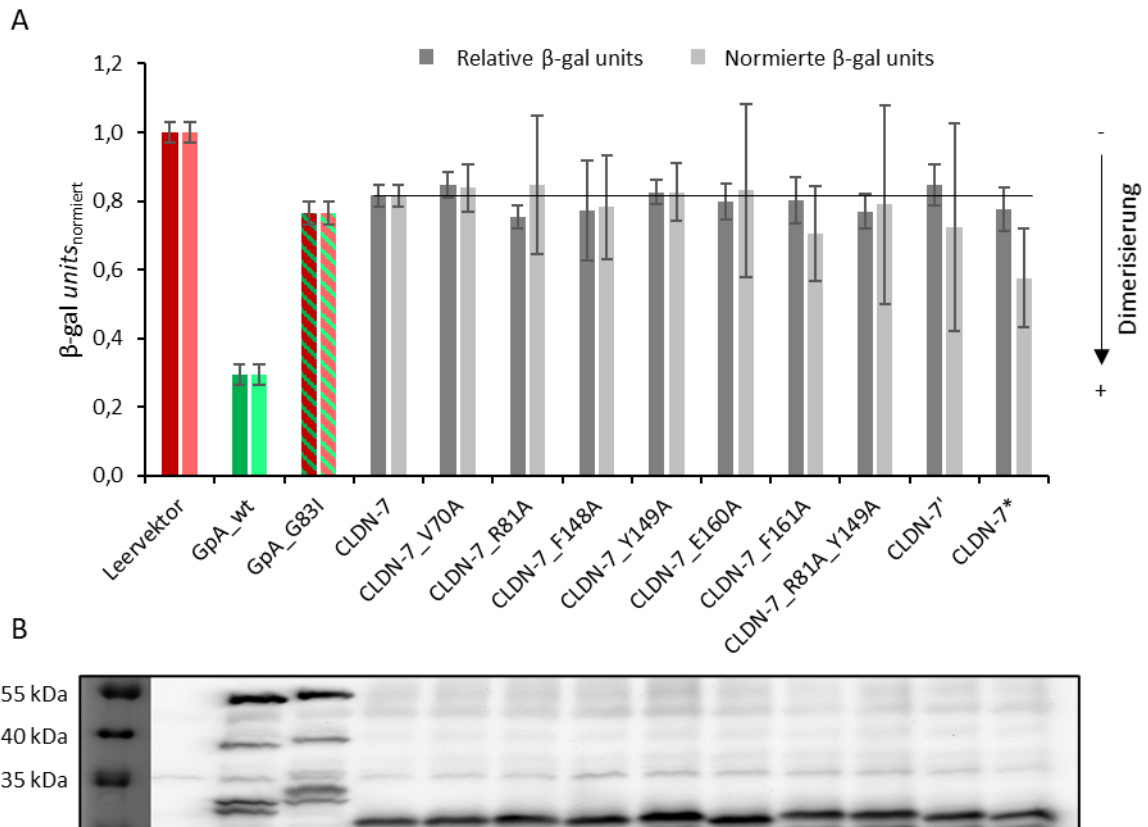
**Abbildung 54: Position der sechs Aminosäuren, die potentiell für eine Interaktion von Claudin-7 in der Membran verantwortlich sind.**

Die Aminosäuren, welche für die Interaktion der Claudine in der Membran wichtig sein sollen, wurden in Gelb hervorgehoben. Es handelt sich um Valin (V) 70, Arginin (R) 81, Phenylalanin (F) 148, Tyrosin (Y) 149, Glutaminsäure (E) 160 und Phenylalanin (F) 161. Alle Reste wurden nach Alanin mutiert. Alle Aminosäuren befinden sich im Bereich der Lipidkopfrgruppen der Membran. Es wurden zwei Ansichten dargestellt, um die Lokalisation zu verdeutlichen. Dabei erfolgte lediglich eine Drehung des Proteins. Abgebildet wurde die Claudin-7 Struktur, welche mittels RaptorX [145], auf Basis der mClaudin-15 Kristallstruktur (PDB-ID 4P79) modelliert wurde.

Zur Untersuchung der oben genannten Reste, wurden jeweils die Einzelmutationen zu Alanin durchgeführt. Die Mutation aller sechs Aminosäuren (V70, R81, F148, Y149, E160, F161) zu Alanin wird im Folgenden mit Claudin-7\* bezeichnet. Da bereits die Mutationen M68, F146, F147 nach Alanin in mClaudin-15 einen signifikanten Unterschied verursachten [29], wurde die analogen Reste in Claudin-7 zu Alanin mutiert. Diese Mutante von V70, F148 und Y149 zu Alanin wird im Folgenden mit Claudin-7' abgekürzt. Zuletzt wurde noch eine Doppelmutante von R81 und Y149 untersucht.

#### 4.3.9.1 Die *in vivo* Dimerisierung der Mutanten im GALLEX-Experiment unterscheidet sich nicht von Claudin-7 Wildtyp

Der Einfluss der Mutationen auf die *in vivo* Oligomerisierung von Claudin-7 wurde mittels des GALLEX-Systems analysiert.



**Abbildung 55: Einfluss der Mutationen auf die Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment.**

Bei steigender IPTG-Konzentration wurde die Homodimerisierung und Expression von Claudin-7 im GALLEX-System analysiert. (A) Hier sind die normierten  $\beta$ -gal units der *in vivo* Homodimerisierung von Claudin-7 und den Interaktions-Mutanten in SU101-Zellen aufgetragen ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung). Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMalp2. Als Positivkontrolle diente die Transmembranhelix des Glycophorin A (GpA). Die Mutante von GpA\_G83I (Glycin 83 zu Isoleucin) zeigt ein vermindertes Dimerisierungsverhalten. Die Normierung erfolgt auf den Mittelwert der Negativkontrolle und wird auf 1,0 gesetzt. In dunkelgrau sind die relativen  $\beta$ -gal units dargestellt. In hellgrau wurde zusätzlich noch das Expressionsniveau mit einbezogen, sodass normierte  $\beta$ -gal units dargestellt werden. Die schwarze Linie dient dem Vergleich mit dem, Claudin-7 Wildtyp. (B) Western Blot-Analyse des SU101 DNase/Lysozym-Verdau zur Ermittlung des Expressionsniveaus. Dazu wurden Proben nach erfolgter Expression genommen, sodass eine  $OD_{600} = 1,0$  vorliegt. Die Bakterien wurden pelletiert und einem DNase/Lysozym-Verdau unterzogen. Von den Extrakten wurden 12  $\mu$ L auf ein SDS-Gel geladen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) wurden 2,5  $\mu$ L aufgetragen. Als Erstantikörper diente LexA DNA Binding Region Antibody, als Zweitantikörper wurde Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase verwendet.

In Abbildung 55 A ist das Ergebnis der GALLEX-Messung dargestellt. pMalp2 dient dabei als Negativkontrolle, GpA als Positivkontrolle und eine Mutante des GpA\_G83I markiert eine mittelmäßige Dimerisierung. Wie auch beim vorherigen Versuch zeigt Claudin-7 (siehe Kap. 4.3.1.1, Abbildung 34) ein eher mäßiges Dimerisierungsverhalten im GALLEX-Experiment. Für die Mutanten konnten bei Betrachtung der relativen  $\beta$ -gal units keine Unterschiede zum wildtypischen Claudin-7 festgestellt werden. Zusätzlich wurde noch das Expressionsniveau der Proteine betrachtet. Hierzu wurde eine Western Blot-Analyse der Zellen nach erfolgter Expression durchgeführt. Diese ist exemplarisch in Abbildung 55 B dargestellt. Bei einer geringeren Expression im Vergleich zum Wildtyp wurde also ein besseres Dimerisierungsverhalten beobachtet. Dies ist nur für die sechsfache Mutante Claudin-7\* zu beobachten. Jedoch konnte festgestellt werden, dass durch Einbeziehen des Expressionsniveaus der

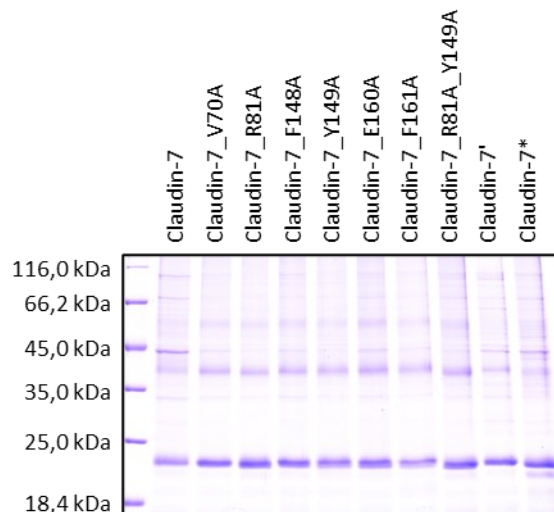
Fehler deutlich zunimmt. Die Mutanten werden demnach unterschiedlich stark exprimiert, weswegen die erhaltenen Ergebnisse einer weiteren Untersuchung bedürfen.

Die untersuchten Interaktions-Mutanten unterscheiden sich im GALLEX-Experiment nicht vom Claudin-7 Wildtyp.

Es wurden krankheitsrelevante Mutanten von Claudin-7 mit dem GALLEX-System untersucht. Dabei wiesen zwei Mutanten (V85D, G130D) ein verbessertes Dimerisierungsverhalten auf. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 88 im Anhang zu entnehmen. Die Mutation V85D führt in Claudin-14 zu Taubheit [194], während die Mutante G130D in Claudin-16 zu einem renalen Magnesiummangel bis hin zu Nierenversagen führt [195]. Diese zwei Mutanten bedürfen genauere Untersuchungen, welche in Zukunft noch ausstehen.

#### 4.3.9.2 Alle Mutanten lassen sich analog zum Claudin-7 Wildtyp reinigen

Analog zum Claudin-7 Wildtyp sollten auch die Mutanten *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurden die Mutanten analog zum Wildtyp in Tuner(DE3)pLysS heterolog exprimiert und anschließend wurde eine Proteinreinigung über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl.: *Immobilized metal chelat chromatography*, IMAC) durchgeführt.



**Abbildung 56: SDS-PAGE-Analyse der über IMAC gereinigten Mutanten von Claudin-7.**

Aufgetragen auf ein 12 %iges SDS-Gel wurden je 7,2 µg der Proben nach der Proteinreinigung über IMAC. Die Eluate der jeweiligen Proteinreinigung wurden aufkonzentriert und in P-Puffer (Tabelle 1), in 5 mM DDM umgepufferten Eluate. Die Claudin-7 Bande wurde bei 26 kDa erwartet, das Dimer bei 52 kDa. Wie bereits beobachtet wurden die Monomer- und Dimerbande etwas niedriger als erwartet detektiert. Claudin-7 und die untersuchten Mutanten konnten mit einem ähnlichen Reinheitsgrad erhalten werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.

In Abbildung 56 ist die SDS-PAGE-Analyse der über IMAC gereinigten Claudin-7 Mutanten und des Wildtyps abgebildet. Alle Proteine weisen die typische Verteilung von Monomerbande (etwa 26 kDa), Dimerbande (etwa 52 kDa) und höheren Oligomerbanden auf. Auch im Reinheitsgrad unterscheiden sich die Proteine kaum. Die komplette SDS-PAGE-Analyse der Proteinreinigungen sind in Abbildung 89, Abbildung 90 und Abbildung 91 im Anhang dargestellt.

Alle Mutanten konnten demnach erfolgreich exprimiert werden und die Proteinreinigung konnte nach Wildtyp-Protokoll erfolgreich durchgeführt werden.

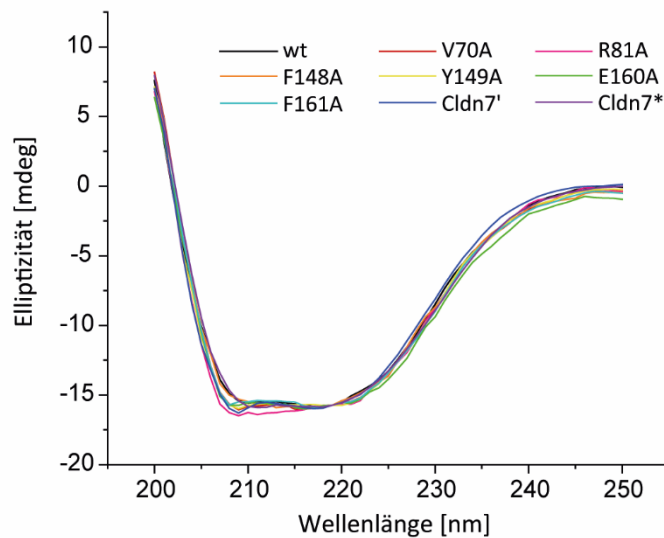
#### **4.3.9.3 Betrachtung der Sekundärstruktur von Claudin-7 und dessen Mutanten mittels CD-Spektroskopie**

Durch die Analyse mittels CD-Spektroskopie können Informationen zur Sekundärstruktur von Proteinen erhalten werden. Somit kann verglichen werden, ob es durch eine Mutation zu einer Veränderung in der Sekundärstruktur kommt. Des Weiteren kann über eine thermische Denaturierung betrachtet werden, ob sich die Stabilität des Proteins verändert.

##### **4.3.9.3.1 Alle Mutanten weisen eine vergleichbare Sekundärstruktur wie der Claudin-7 Wildtyp auf**

Zunächst sollte die Sekundärstruktur der einzelnen Mutanten verglichen werden. Die erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 57 abgebildet. Dabei konnte beobachtet werden, dass alle CD-Spektren eine sehr ähnliche Form aufweisen. Lediglich im Bereich um 210 nm konnten minimale Unterschiede detektiert werden. Eine Analyse mit dem Programm BESTSEL [196] zeigte jedoch für alle Spektren eine ähnliche Verteilung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, wie bereits der Wildtyp von Claudin-7.

Die Ergebnisse der CD-Messung der Mutanten zeigen, dass in der Sekundärstruktur kaum Unterschiede zum Wildtyp vorliegen. Folglich wurde die Faltung der Proteine nicht durch die Mutation dieser Aminosäuren beeinflusst.



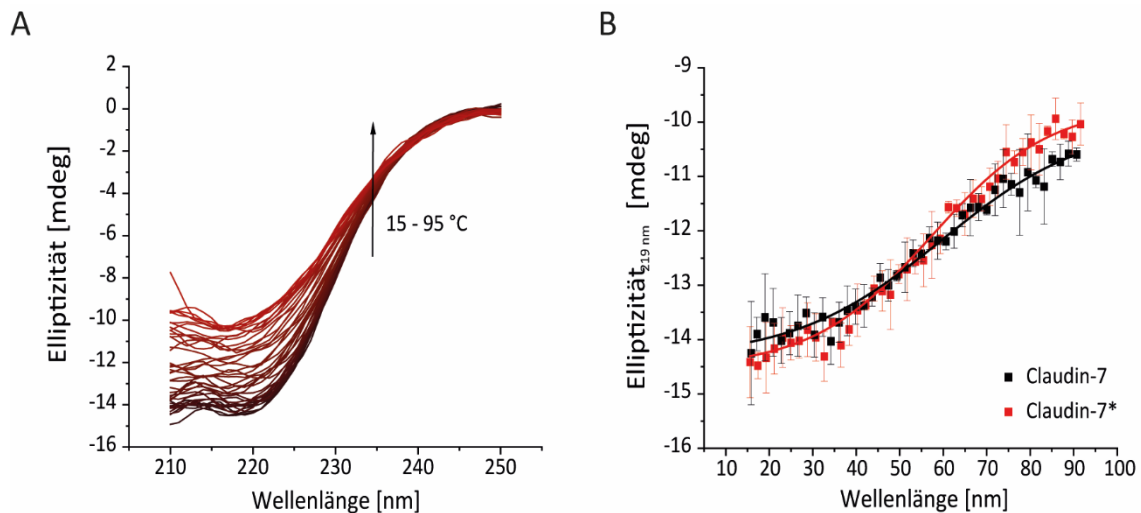
**Abbildung 57: CD-Spektren von Claudin-7 und den Mutanten.**

Dargestellt ist das CD-Spektrum von Claudin-7 und den Mutanten V70A, R81A, F148A, Y149A, E160A und F161A in P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM. Die Spektren weisen alle auf den erwarteten hohen  $\alpha$ -helicalen Anteil und die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Claudin-7 Kopfgruppe hin.

#### 4.3.9.3.2 Claudin-7\* weist eine geringere Thermische Stabilität als der Wildtyp auf

Die Stabilität der Sekundärstruktur von Proteinen kann mittels thermischer Denaturierung und Detektion durch CD-Spektroskopie betrachtet werden. Wie für den Wildtyp wurde die thermische Stabilität von Claudin-7\* über die Elliptizität bei 219 nm verfolgt. Es wurde nur Claudin-7\* betrachtet, da hier aufgrund der maximalen Mutationen die maximale Veränderung zu erwarten war.

In Abbildung 58 A sind die CD-Spektren der thermischen Denaturierung von Claudin-7\* dargestellt. Analog zum Claudin-7 Wildtyp (Abbildung 40) konnte festgestellt werden, dass es zu keiner vollständigen Entfaltung der hauptsächlich  $\alpha$ -helikalen Struktur bei 95 °C kommt. Um Unterschiede zum Wildtyp zu analysieren, wurde die Elliptizität bei 219 nm verglichen. Diese sind für Wildtyp und Claudin-7\* in Abbildung 58 B abgebildet. Der Verlauf der beiden Kurven ist sehr ähnlich. Jedoch konnte festgestellt werden, dass der Wendepunkt der Kurve für Claudin-7\* bei  $57,3 \text{ °C} \pm 1,1 \text{ °C}$  liegt und somit  $2,4 \text{ °C}$  niedriger als für den Wildtyp ermittelt wurde. Der etwas andere Verlauf der Kurve kann auch auf einen anderen Entfaltungsweg als beim wildtypischen Claudin-7 hinweisen.



**Abbildung 58: Thermische Denaturierung von Claudin-7\*.**

(A) Dargestellt ist der Einfluss einer Temperaturerhöhung von 15 °C auf 95 °C auf das CD-Spektrum von Claudin-7\*. Dabei konnte festgestellt werden, dass es nur zu einer geringfügigen Entfaltung von Claudin-7\* kommt. Bei 95 °C konnte noch eine Mischung aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt mit verringerter Intensität detektiert werden. (B) Hier ist der Verlauf der Elliptizität bei 219 nm in Abhängigkeit der Temperatur im Vergleich zu Claudin-7 Wildtyp aufgetragen ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung). Der Verlauf ist abgeflacht sigmoidal. Die Kurve besitzt einen Wendepunkt bei  $57,3 \text{ °C} \pm 1,1 \text{ °C}$ . Dieser ist um  $2,4 \text{ °C}$  niedriger als für den Claudin-7 Wildtyp. Somit ist die Struktur von Claudin-7\* etwas instabiler als der Wildtyp.

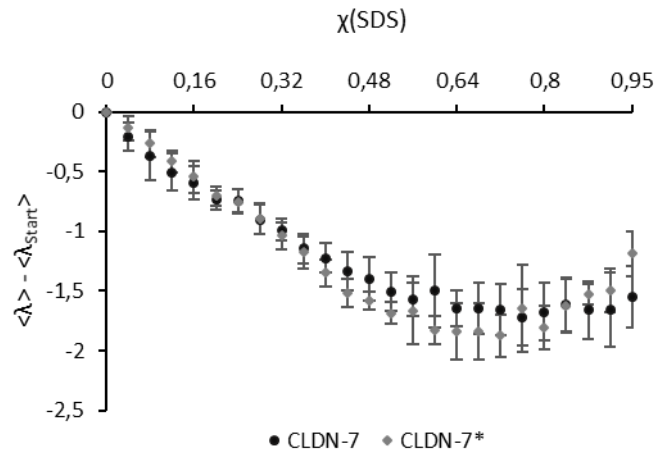
Die Sekundärstruktur von Claudin-7\* besitzt eine hohe thermische Stabilität, hat jedoch im Vergleich zum Wildtyp an Stabilität eingebüßt. Die Mutation von sechs Aminosäureresten führt also zu einer verminderten Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung.

#### 4.3.9.4 Die SDS-induzierte Entfaltung der Mutanten unterscheidet sich nicht vom Wildtyp

Der Einfluss von Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) auf die Entfaltung von Claudin-7\* wurde über die Tryptophan-Fluoreszenz beobachtet. Dabei sollte die Veränderung der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  betrachtet werden. Diese Veränderung wurde über die Differenz zum Startwert ( $\chi(\text{SDS}) = 0$ ) bei steigendem  $\chi(\text{SDS})$  betrachtet.

Der Einfluss von SDS auf die Tryptophan-Umgebung von Claudin-7 und Claudin-7\* ist in Abbildung 59 dargestellt. Wie bereits für den Wildtyp beobachtet nimmt die mittlere Wellenlänge zunächst ab. Dann scheint die mittlere Wellenlänge für Claudin-7\* jedoch wieder anzusteigen. Jedoch ist dieser Anstieg nicht vom Plateau des Wildtyps bei hohen  $\chi(\text{SDS})$  zu unterscheiden. Folglich werden auch für Claudin-7\* die Tryptophan-Seitenketten in eine hydrophobere Umgebung exponiert. Auch in der SDS-PAGE-Analyse konnten keine Veränderungen detektiert werden (Abbildung 92 Anhang).

Auch für die restlichen Mutationen im Interaktionsbereich konnte weder ein Unterschied im Verlauf der mittleren Wellenlänge (Abbildung 93, Abbildung 95 Anhang), noch in der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 94, Abbildung 96 Anhang) detektiert werden.



**Abbildung 59: Betrachtung der Entfaltung von Claudin-7 und Claudin-7\* über die Differenz der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle - \langle \lambda \rangle_{\text{start}}$ .**

Verlauf der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  von Claudin-7 (CLDN-7, schwarz) und Claudin-7\* (CLDN-7\*, grau) bei ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Die mittlere Wellenlänge nimmt dabei bis zu einem  $\chi(\text{SDS})$  von 0,6 ab und bleibt dann konstant. Die Tryptophan-Seitenketten werden in eine hydrophobere Umgebung exponiert ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung).

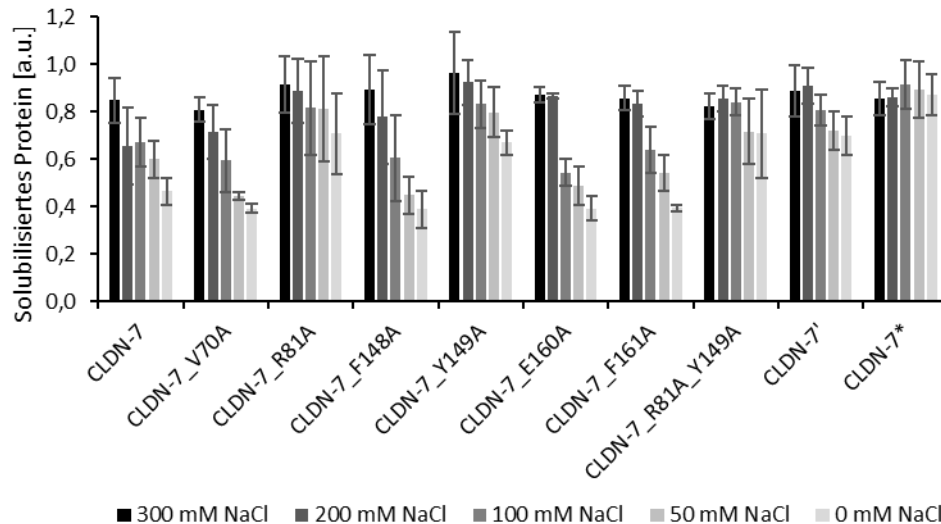
Die untersuchten Aminosäuren scheinen keinen Einfluss auf die SDS-induzierte Entfaltung von Claudin-7 zu haben.

#### 4.3.9.5 Die Mutanten weisen unterschiedlich starke elektrostatische Wechselwirkungen auf

Analog zum Claudin-7 Wildtyp sollte der Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Clusterbildung der Mutationen im Interaktionsbereich untersucht werden. Bei Reduktion der NaCl-Konzentration konnte für den Wildtyp eine reduzierte Menge an solubilisiertem Protein detektiert werden (Abbildung 45). Dieser Versuch wurde nun, wie im Methodenteil Kapitel 3.3.13 beschrieben, für alle Mutanten durchgeführt.

Abbildung 60 stellt die Auswirkung der Reduktion der NaCl-Konzentration auf Claudin-7 und die Mutationen im Interaktionsbereich dar. Zur vereinfachten Ansicht wurden nur ausgewählte NaCl-Konzentrationen dargestellt. Die kompletten Messwerte und die SDS-PAGE-Analysen sind in Abbildung 97 (Anhang) dargestellt. Der Anteil des solubilisierten Proteins nimmt für den Wildtyp bei sinkender NaCl-Konzentration auf etwa 40 % ab. Für die Mutanten V70A, F148A, E160A und F161A konnte dies ebenfalls beobachtet werden. Diese Mutationen haben also keinen Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Claudin-Proteinen. Für die Mutanten R81A und Y149A konnte lediglich eine Reduktion des solubilisierten Proteins auf etwa 75 % beobachtet werden. Die Mutation dieser beiden Aminosäuren hat also einen Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen. Auch für die Doppelmutante aus diesen zwei Mutationen (R81A\_Y149A), und die Dreifachmutante Claudin-7' konnte eine Reduktion auf etwa 75 % beobachtet werden. Dies bedeutet, dass der Effekt beider Mutationen nicht additiv ist. Für die Sechsfachmutante Claudin-7\* konnte kein Effekt durch die

reduzierte Salzkonzentration beobachtet werden. Claudin-7\* blieb auch ohne NaCl im Puffer vollständig solubilisiert. Jegliche elektrostatische Wechselwirkung, welche im Wildtyp zur Clusterbildung führt, ist demnach nicht mehr vorhanden.



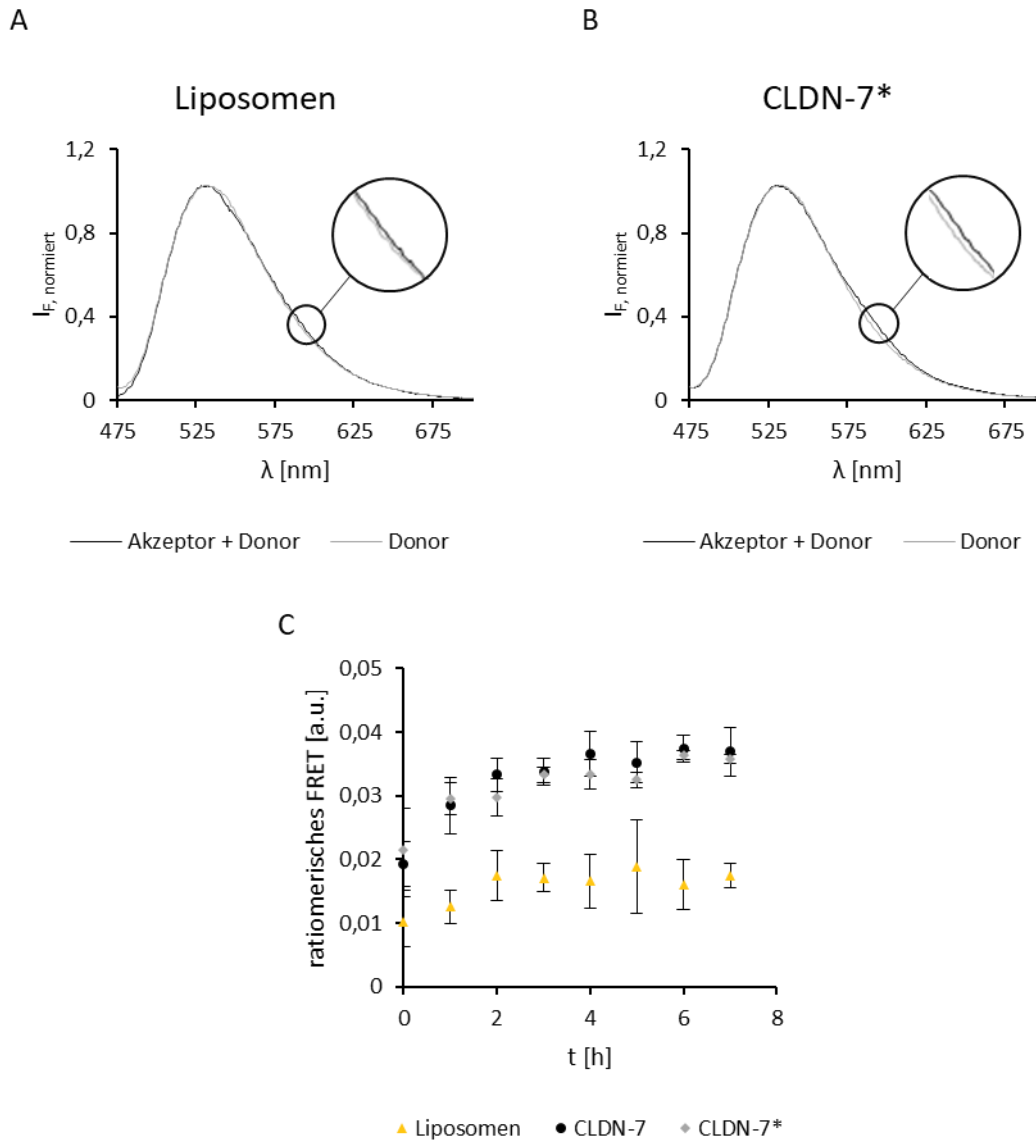
**Abbildung 60: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Claudin-7, bzw. der Mutationen im Interaktionsbereich.**

Es wurde eine Proteinreinigung mittels IMAC in P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM durchgeführt. Das erhaltene Eluat wurde aufgeteilt und in die Puffer S1, S2, S3, S5, S7 und S10 dialysiert. S1 entspricht dabei dem Reinigungspuffer, S2 besitzt kein Glycerol, die Puffer S3, S5 und S7 besitzen eine sinkende NaCl-Konzentration (200 mM, 100 mM, 50 mM). Puffer S10 besteht nur noch aus 50 mM Phosphat, pH 8. Gezeigt wurde der Anteil an solubilisiertem Claudin-7 (CLDN-7) in Abhängigkeit der Salzkonzentration. Die erhaltenen Werte stammen aus der *ImageJ*-Auswertung [128] der Claudin-7 Monomerbande einer SDS-PAGE-Analyse des zentrifugierten Überstandes nach der Dialyse in den entsprechenden Puffer. Dabei wurde die Probe der Dialyse in S1/Reinigungspuffer auf 1 normiert ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung).

Durch die Betrachtung der elektrostatischen Wechselwirkungen konnte festgestellt werden, dass die Aminosäure-Seitenketten R81 und Y149 einen Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen haben. Des Weiteren wurde beobachtet, dass erst durch Mutation aller potenzieller Interaktionsseitenketten keine elektrostatischen Wechselwirkungen mehr vorliegen.

#### 4.3.9.6 Die Kopf-zu-Kopf Interaktion ist bei Claudin-7\* nicht beeinträchtigt

Zur Untersuchung der Kopf-zu-Kopf-Interaktion wurde Claudin-7\* in markierte Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen rekonstituiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Kopfgruppeninteraktion mittels eines FRET-Assays (siehe Kap. 3.5.2).



**Abbildung 61: Ergebnis des FRET-Assays zur Betrachtung der Kopf-zu-Kopf-Interaktionen von Claudin-7\*.**

(A) Emissionsspektrum von NBD-PE (Donor), einmal allein (hellgrau) und einmal nach Zugabe des Akzeptors (LissRhod-PE) in Liposomen nach 7 h Inkubation (schwarz). Es konnte kein Unterschied zwischen den Spektren bei 583 nm (Emissionsmaximum von LissRhod-PE) beobachtet werden. (B) Emissionsspektrum von NBD-PE (Donor), einmal allein (hellgrau) und einmal nach Zugabe des Akzeptors (LissRhod-PE) nach 7 h Inkubation in Proteoliposomen (schwarz). Es konnte ein minimaler Unterschied zwischen den Spektren bei 583 nm (Emissionsmaximum von LissRhod-PE) beobachtet werden. Zur genaueren Betrachtung wurde das ratiometrische FRET-Signal für Liposomen und Proteoliposomen ermittelt (C). Dabei konnte ein deutlicher Unterschied zwischen Liposomen und Proteoliposomen beobachtet werden ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung). Claudin-7\* (CLDN-7\*) vernetzt also die NBD-PE-Liposomen mit den LissRhod-PE-Liposomen wodurch ein FRET-Signal detektiert werden konnte.

In Abbildung 61 sind die Ergebnisse des FRET-Assays mit Claudin-7\* dargestellt. Wie bereits in Kapitel 4.3.8.2 beschrieben, konnte mit Liposomen kein FRET-Signal erzeugt werden (Abbildung 61 A, Abbildung 48 A). Für Claudin-7\* konnte eine minimale Veränderung des Fluoreszenzspektrums beobachtet werden, wenn Akzeptor- und Donor-Proteoliposomen gemischt werden (Abbildung 61 B). Da diese minimale Veränderung optisch schwer zu vergleichen ist, wurde die ratiometrische FRET-Effizienz  $E_{rat}$  ermittelt (Formel (7), Kap. 3.5.2). Die zeitaufgelöste ratiometrische FRET-Effizienz ist in Abbildung 61 C dargestellt. Die Claudin-7\*-Proteoliposomen zeigen dabei ein ähnliches Verhalten wie

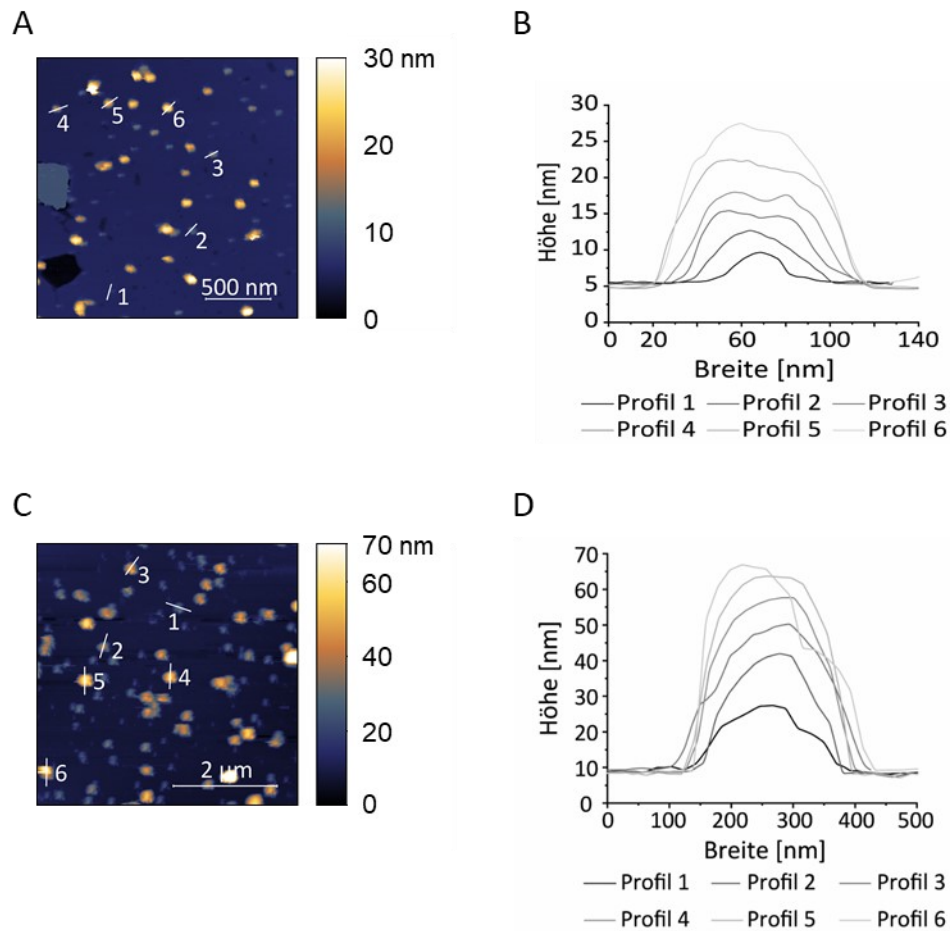
Claudin-7 Wildtyp-Proteoliposomen. Dabei unterschieden sich die Proteoliposomen deutlich von den Liposomen. Schon direkt nach der Mischung der unterschiedlich markierten Proteo-/Liposomen kann für die Proteoliposomen eine ratiometrische FRET-Effizienz ermittelt werden, welche von der der Liposomen zu unterscheiden ist. Wie beim Wildtyp stieg die ratiometrische FRET-Effizienz von Claudin-7\* Proteoliposomen im Laufe der Inkubationszeit an, während die Liposomen nach zwei Stunden einen maximalen Wert erreichten.

Durch Claudin-7\* kommt es demnach ebenso wie beim Wildtyp zu einer Vernetzung der Proteoliposomen durch die Kopfgruppe. Somit haben die mutierten Aminosäuren keinen Einfluss auf die Kopfgruppeninteraktion zwischen Claudin-Proteinen.

#### **4.3.9.7 Eine Membranstapelung durch Claudin-7\* konnte mittels AFM nachgewiesen werden**

Durch AFM konnte bereits nachgewiesen werden, dass Claudin-7 zu einer Membranstapelung führt (siehe Kap. 4.3.8, Abbildung 50). Nachdem eine Kopfgruppeninteraktion von Claudin-7\* im FRET-Assay nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob dies auch mittels AFM bestätigt werden kann. Dabei wurden sowohl Proteoliposomen mit NaCl hergestellt als auch solche ohne.

In Abbildung 62 sind typische Aufnahmen der Claudin-7\* Membranen mit NaCl im Aufnahmebuffer (A), bzw. ohne NaCl im Aufnahmebuffer (C), dargestellt. Diese weisen eine große Ähnlichkeit zu den Aufnahmen von Claudin-7 Wildtyp Membranen auf. Es konnten Spots mit unterschiedlicher Höhe detektiert werden. Diese unterschieden sich jeweils um ein Vielfaches von 5 nm. So konnten für die Claudin-7\* Membranstapel mit NaCl im Puffer Spots mit 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm und 30 nm detektiert werden. Für die Membranstapel ohne NaCl im Puffer konnten Spots mit einer Höhe von 20 nm, 35 nm, 40 nm, 50 nm, 55 nm und 60 nm detektiert werden. Diese befinden sich über dem Grundniveau der DOPC-Lipiddoppelschicht. Die detektierten Höhenprofile haben analog zum Wildtyp eine kuppelförmige Struktur mit abgeflachter Oberfläche. Dies legt nahe, dass Claudin-7\* ebenfalls zur Stapelung von Membranen führt. Die Verteilung des Durchmessers der gemessenen Membranstapel ist von der des Wildtyps nicht zu unterscheiden. Ebenfalls wie beim Wildtyp konnte für Claudin-7\* beobachtet werden, dass die Membranstapel einen größeren Durchmesser bei geringerer Ionenstärke aufweisen. Für die Analyse der Feinstruktur auf der Oberfläche konnten keine Aufnahmen mit ausreichender Auflösung aufgenommen werden.



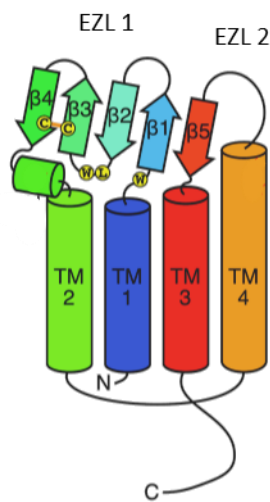
**Abbildung 62: Profil-Analyse der AFM Aufnahme von Claudin-7\* Membranen mit und ohne NaCl.**

AFM-Bilder der an Mica gebundenen Claudin-7\* Membranen mit (A) und ohne (C) NaCl und die Profilanalyse einzelner Punkte (B, D). Dabei wurde die Profilanalyse jeweils rechts des AFM-Bildes abgebildet. Der Ursprung des jeweiligen Profils wurde in der AFM-Aufnahme markiert. Die Ansätze wurden in P-Puffer (Tabelle 1), bzw. S10-Puffer (50 mM NaCl, pH 8) vermessen. Der Falschfarbenmarker gibt die Höhe der Probe an. Die Bilder und Profile wurden mit dem Programm GWYDDION [163] bearbeitet, bzw. erstellt. Es konnte festgestellt werden, dass durch Claudin-7\* Membranen aufeinander gespreitet wurden.

### 4.3.10 Diskussion

#### 4.3.10.1 *In vivo* Untersuchungen der Oligomerisierung und Lokalisation von Claudin-7

Durch Verwendung des GALLEX-Experiments sollte die Oligomerisierung von Claudin-7 *in vivo* untersucht werden. Obwohl das GALLEX-Experiment ursprünglich für die Analyse der Oligomerisierung von einzelnen Transmembranhelices entwickelt wurde, konnte anhand des Aquaglyceroporins GlpF bereits gezeigt werden, dass die Analyse auch für ganze Membranproteine geeignet ist [131]. Bei der Analyse von Claudin-7 wurde nur ein geringer Grad an Oligomerisierung festgestellt, obwohl in der Western Blot-Analyse Dimere detektiert werden konnten (siehe Abbildung 34). Für die detektierte geringe Dimerisierung von Claudin-7 könnte es verschiedene Ursachen geben. Aufgrund von sterischen



**Abbildung 63: Schematische Darstellung eines Claudin-Proteins.**

Sekundärstruktur von Claudin-Proteinen verändert nach [114]. Zwischen den Cystein-Seitenketten  $\beta 3$  und  $\beta 4$  befindet sich eine Disulfid-Brücke (orange Linie). Die Konsenssequenz ist mit gelben Kreisen dargestellt. N: N-Terminus, C: C-Terminus, EZL 1: Extrazellulärer Loop 1, EZL 2: Extrazellulärer Loop 2, TM1-4: Transmembranhelix 1 bis 4,  $\beta 1$ -5:  $\beta$ -Faltblattstränge 1 bis 5.

Einflüssen könnte eine Dimerisierung der LexA-Domänen behindert sein, welche am N-Terminus des Claudin-7 Proteins angefügt wurden. Damit würde keine Repression der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression erfolgen. Beispielsweise könnte die Dimerisierung der LexA-Domäne behindert sein, wenn TM1 (Transmembranhelix 1, siehe Abbildung 63) des einen Claudin-7-Proteins nicht mit der TM1 des zweiten Claudin-7-Proteins interagiert. Findet die Interaktion der TM1 z.B. mit TM4 statt so könnten der Abstand der LexA-Domäne zu groß sein, um zu dimerisieren. Je nach Orientierung der Claudin-7-Monomere zueinander kann somit möglicherweise keine Dimerisierung mit dem GALLEX-System gemessen werden. Dies würde mit den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse von mClaudin-15 korrelieren, welche nicht auf eine Interaktion der analogen Helices hinweist [29]. Auch die von Zhao *et al.* [187] vorgestellten Kontaktflächen von Claudin-15 sprechen

dafür, dass mit dem GALLEX-System kaum eine Dimerisierung beobachtet werden kann. Zum einen spricht man von einer axialen *cis*-Interaktionsfläche (X1), welche durch eine hydrophobe Interaktion zwischen der extrazellulären Helix und dem extrazellulären Loop 2 (siehe Kap. 4.3.10.6, Abbildung 65). Zum anderen spricht man von der Cis-1 Interaktionsfläche welche der X1 ähnelt, die Monomere sind in Bezug zur Membranebene jedoch um etwa  $17^\circ$  rotiert [187]. Des Weiteren konnte für die Transmembranhelix von GpA festgestellt werden, dass die Länge der Transmembranhelix einen Einfluss auf die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hat. Bereits eine Verlängerung der Helix um eine Aminosäure führte zu einer deutlich verminderten Dimerisierung [197]. Geringfügige Änderungen der Lokalisation oder Orientierung der LexA-Domänen zueinander können demnach einen Effekt auf die

Ergebnisse des GALLEX-Experiments haben. Eine nicht detektierte Dimerisierung bedeutet demnach nicht zwangsläufig, dass keine Dimerisierung des Proteins (hier Claudin-7) vorliegt, da im Western Blot klar eine Dimerisierung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 34).

Die Lokalisation von Claudin-7 *in vivo* sollte durch Transfektion unterschiedlicher fluoreszenzmarkierter Konstrukte in HEK-, HeLa- und L-Zellen untersucht werden. Dabei wurde stets eine cytosolische Lokalisation beobachtet (siehe Anhang Abbildung 82). Dies entspricht nicht der Erwartung, da es sich bei Claudin-7 um ein Membranprotein handelt. Für die veränderte Lokalisation von Claudin-7 kann es verschiedene Ursachen geben, z.B. könnte es bei der Expression des Claudin-7-mCherry zu einer Fehlfaltung gekommen sein. Dies würde dann zum Abbau des Proteins führen. Das lösliche fluoreszierende mCherry-Protein hat eine ähnliche Größe (26,7 kDa) wie Claudin-7 (26 kDa). Aufgrund dessen könnte das fusionierte mCherry-Protein für eine Solubilisation des Proteins verantwortlich sein und der exponierte hydrophobe Transmembranbereich des Claudin-7 anschließend ebenfalls zu einem Abbau des Proteins führen. Eine weitere Ursache für die veränderte Lokalisation könnten fehlende Interaktionspartner, wie z.B. EpCAM [107] sein. Für die Claudin-Paare 19 und 16 sowie 4 und 8 konnte festgestellt werden, dass diese nur in Gegenwart des anderen Claudin-Proteins zur Zellmembran transportiert wurden [198, 199]. Zusätzlich kann die verwendete Zelllinie einen Einfluss auf die Lokalisation von überexprimiertem Claudin-7 haben. Zur Untersuchung von Claudin-7 wurden bereits LLC-PK1-Zellen (Schweine Nieren Epithelzellen) verwendet. Dabei konnte Claudin-7 wie erwartet an der Zellmembran detektiert werden [110, 111]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es verschiedene Ursachen für die Fehllokalisierung von Claudin-7 im Cytoplasma gibt und das Expressionssystem einer Optimierung bedarf.

#### **4.3.10.2 Claudin-7 kann erstmals aus einer heterologen Expression in *E. coli* gewonnen werden**

Zur Untersuchung der Funktion und Struktur von Proteinen *in vitro* werden diese oftmals heterolog exprimiert und gereinigt. Für die Experimente werden Protein-Mengen im Milligramm-Bereich benötigt. *E. coli* eignet sich aufgrund seines schnellen Wachstums und den kostengünstigen Kultivierungsbedingungen gut für eine heterologe Expression [200]. Die heterologe Expression von Proteinen der Claudin-Familie ist in der Literatur nur wenig beschrieben. Es wurden unterschiedliche Zellsysteme, bzw. zellfreie Systeme untersucht. Z.B. wurden für strukturelle Untersuchungen von Claudin-15 und Claudin-4 *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen verwendet [29, 201]. Auch in *Pichia Pastoris* (Hefezellen) konnte Claudin-4 heterolog exprimiert werden [155]. Des Weiteren konnte auch in einem zellfreien System eine erfolgreiche Expression von Claudin-1, -2, -3, -4 und -5 erreicht werden [202]. Eine Expression in *E. coli* wurde bisher nicht publiziert. In dieser Arbeit konnte erstmals

gezeigt werden, dass eine Expression von Claudin-7 in *E. coli* erfolgreich durchgeführt werden kann (Abbildung 35). Dabei konnte nach der Proteinreinigung über IMAC eine Ausbeute von 1,8 mg pro Liter Expressionskultur Claudin-7 erhalten werden (Abbildung 37). Die Expression erfolgte im Stamm Tuner(DE3)pLysS. Dieser *E. coli*-Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine sensitive Kontrolle der Expression über die eingesetzte IPTG-Konzentration ermöglicht [179]. Des Weiteren wird eine basale Expression der T7 RNA Polymerase durch die Expression von T7 Lysozym verhindert [179]. Diese Eigenschaften ermöglichen es negative Einflüsse des exprimierten Proteins, wie z.B. cytotoxische Eigenschaften, auf das Wachstum der Bakterien zu reduzieren. Fehlgefaltete oder toxische Proteine reichern sich dabei in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) an [181]. Dies konnte bei der Expression von Claudin-7 beobachtet werden (Abbildung 37). Etwa die Hälfte des exprimierten Claudin-7 entfiel dabei auf die Fraktion der Einschlusskörperchen. Diese wurden während der Proteinreinigung verworfen, da nur membranständiges Claudin-7 verwendet werden sollte. Membranständiges Claudin-7 konnte nur in Gegenwart von Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) solubilisiert werden (Abbildung 36). LDAO ist ein zwitterionisches Detergenz, welches in seiner Struktur dem SDS ähnlich ist. Es ist somit härter als Detergenzien mit einem Zuckerrest (DDM, OG) oder das ebenfalls zwitterionische CHAPS, welches ein Sterin-Grundgerüst besitzt. Auffällig ist jedoch, dass bei der Solubilisation und anschließenden Analyse in einer SDS-PAGE die Claudin-7 Oligomere nicht aufgelöst werden. Dieses Phänomen konnte für Claudin-4, aus Sf9-Zellen in PFO solubilisiert, ebenfalls beobachtet werden [201]. Die Oligomerbildung in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) spricht für eine große Stabilität der Claudin-7 Oligomere. Die Struktur und Stabilität von Claudin-7 und seinen Oligomeren wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### **4.3.10.3 Claudin-7 besitzt eine hauptsächlich $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur und ist relativ stabil gegenüber Hitzedenaturierung**

Die Sekundärstruktur von rekombinantem Claudin-7 wurde mittels CD-Spektroskopie analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Claudin-7 eine hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur aufweist (Abbildung 39). In der Literatur finden sich keine CD-Spektren von Claudin-7 oder anderen Claudin-Proteinen. Lediglich an einem Peptid, welches seinen Ursprung im extrazellulären Loop 1 (EZL 1) des Claudin-15 hat, wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt [203]. Durch Zugabe von SDS konnte die Sekundärstruktur des Peptids in die erwartete  $\beta$ -Faltblattstruktur des EZL 1 überführt werden [203]. Auch im Spektrum von Claudin-7 ist der erwartete Anteil an  $\beta$ -Faltblatt Struktur enthalten, wird jedoch vom Spektrum der  $\alpha$ -Helices überlagert. Für eine aussagekräftigere Strukturanalyse wäre die Aufnahme von CD-Spektren von 190 nm bis 250 nm ideal. Dies ist jedoch aufgrund des in diesem Fall benötigten hohen Salzgehaltes (300 mM NaCl) im Puffer

nicht möglich, da Chlorid-Ionen unterhalb von 200 nm stark absorbieren [204]. Dieser hohe Salzgehalt verhindert die Präzipitation des Proteins (siehe Kap. 4.3.6) und konnte daher nicht gesenkt werden.

*In vivo* Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Fieber, erhöhter Temperatur oder Training die Permeabilität von *tight junctions* erhöht ist [205]. Dabei konnte bisher nicht herausgefunden werden, welche Komponente der *tight junctions* durch die erhöhte Temperatur beeinflusst wurde. Eine Veränderung des Expressionsniveaus von Claudin-Proteinen, bis zu einer Temperatur von 41 °C, konnte nicht beobachtet werden [206]. Höhere Temperaturen wurden nicht betrachtet, da diese physiologisch nicht relevant sind. In dieser Arbeit wurde die thermische Stabilität von Claudin-7 mittels CD-Spektroskopie analysiert. Dabei wurden CD-Spektren in Temperaturschritten von 2 °C im Bereich von 15 °C bis 95 °C aufgenommen (siehe Abbildung 40). Betrachtet man die thermische Denaturierung von Claudin-7 bis 41 °C kann festgestellt werden, dass hier kaum eine Veränderung der Sekundärstruktur zu beobachten ist (siehe Abbildung 40 B). Die Ursache für eine erhöhte Permeabilität der *tight junctions* bei einer Temperaturerhöhung kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann eine veränderte Oligomerisierung von Claudin-7 zu einer erhöhten Permeabilität führen. Zum anderen können Proteinen welche mit Claudin-7 interagieren durch die erhöhte Temperatur beeinflusst werden. Die mögliche Interaktion dieser Proteine mit Claudin-7 stellt wiederum eine denkbare Erklärung für die erhöhte Permeabilität der *tight junctions* dar.

Zur weiteren Analyse der Claudin-7 Sekundärstruktur wurde die Elliptizität bei 219 nm in Abhängigkeit der Temperatur betrachtet (Abbildung 40 B). Dadurch konnte die Schmelztemperatur von Claudin-7 bei  $59,7\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$  bestimmt werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass auch bei 95 °C keine komplette Entfaltung des Claudin-7 vorlag. Diese hohe thermische Stabilität ist bei Membranproteinen nicht ungewöhnlich [207–209]. Bei der Hitzedenaturierung von Membranproteinen werden vermutlich zunächst die extrazellulären Domänen entfaltet, während die Transmembranhelices eine höhere Stabilität aufweisen [210]. Zusätzlich könnte die Homooligomerisierung des Claudin-7 zu einer weiteren Stabilisierung der Sekundärstruktur beitragen. Für murines Claudin-3 konnte eine Schmelztemperatur von 58,6 °C bestimmt werden [211]. Diese ist sehr ähnlich zu der für Claudin-7 bestimmten Temperatur. Jedoch wurde die Struktur des mClaudin-3 nicht über CD-Spektroskopie verfolgt, sondern mittels Gelpermeationschromatographie [211]. Dabei wurde die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz des Claudin-Proteins detektiert. Nativ gefaltetes Protein kann in der Gelpermeationschromatographie von entfaltetem Protein getrennt werden. Über den Vergleich der Retentionszeiten wird dann eine Schmelzkurve des Proteins ermittelt. Die Tryptophan-Fluoreszenz des nativen Peaks wird auf die des nativen Peaks bei 4 °C normiert. Die exakten Werte der Schmelzpunkte sind somit nicht vergleichbar, geben jedoch einen Hinweis darauf, dass die Stabilität der beiden Proteine ähnlich ist. Genauere Analysen der Entfaltung sind aufgrund des gemessenen

Wellenlängenbereichs (210 nm bis 250 nm) nicht möglich. Das Auftreten eines isosbestischen Punktes würde zum Beispiel auf einen zweistufigen Entfaltungsprozess hinweisen [209]. Dieser tritt jedoch meist bei Wellenlängen um 200 nm auf [208, 209], welche aufgrund des NaCl-haltigen Puffers nicht analysiert werden konnten. Dieser war notwendig, um eine Präzipitation des Proteins zu verhindern (siehe Kap. 4.3.6).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Claudin-7 die erwartete hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur mit  $\beta$ -Faltblatt-Anteilen aufweist. Das Protein ist wie erwartet sehr stabil gegenüber Hitze und besitzt einen Schmelzpunkt von  $59,7\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ . Die *in vivo* bei einer höheren Temperatur beobachtete erhöhte Permeabilität von *tight junctions* beruht aufgrund dieser Ergebnisse vermutlich nicht auf einer Entfaltung von Claudin-7.

#### **4.3.10.4 Claudin-7 liegt in Detergenzmizellen als Oligomer vor**

Mittels Gelpermeationschromatographie wurde in dieser Arbeit die Oligomergröße von Claudin-7 Homooligomeren bestimmt. Dabei konnten in n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM)-Mizellen Monomere, Hexamere und sogar höhere Oligomere detektiert werden (Abbildung 41). Die beobachtete Verteilung von Monomeren, Hexameren und weiteren höheren Oligomeren entspricht den Erwartungen, da Claudin-7 bereits in der SDS-PAGE-Analyse eine ähnliche Verteilung aufweist (Abbildung 37). Für andere Claudin-Proteine in DDM-Mizellen wurden bisher verschiedene Oligomerisierungsgrade beschrieben. So konnten nach einer Expression von Claudin-4 in *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen und *Pichia Pastoris* (Hefezellen) bei einer Gelpermeationschromatographie keine höheren Oligomere detektiert werden [155, 201]. Dahingegen konnte Claudin-4 aus einer zellfreien Expression als Multimer detektiert werden [202], jedoch wurde keine Oligomerverteilung beobachtet wie in dieser Arbeit. Die Oligomerisierung von Claudin-Proteinen wurde auch in *in vivo* Experimenten gezeigt. Für Claudin-1, -2 und -3 konnte sowohl Homo-, als auch Heterooligomerisierung in L-Fibroblasten nachgewiesen werden [212]. Zusätzlich konnte für Claudin-1, -2 und -7 eine Oligomerisierung (Dimere oder Trimere) in MDCK-Zellen beobachtet werden [213]. Dies zeigt, dass eine Oligomerisierung von Claudin-7 den Erwartungen entspricht. Der in der Literatur beschriebene Oligomerisierungsgrad unterscheidet sich von dem in dieser Arbeit beobachteten Oligomerisierungsgrad. Im Gegensatz dazu konnte eine Organisation in Hexameren *in vitro* für Claudin-4 [201] und *in vivo* für Claudin-5 [104] nachgewiesen werden.

Aufgrund des Durchmessers der *tight junction* Stränge wird eine Organisation der Claudin-Proteine in Hexameren vermutet [214]. Dies stimmt mit der Beobachtung von Hexameren in dieser Arbeit überein. Bei den beobachteten höheren Oligomeren könnte es sich demnach um Aggregate handeln.

Andererseits legen neue Untersuchungen einen mehrstufigen Prozess der Claudin-Polymerisation nahe: zunächst findet die Oligomerisierung in der Membran (*cis*) statt und anschließend wird durch die Interaktion mit Claudin-Proteinen der Nachbarzelle (*trans*) eine weitere *cis*-Polymerisation getriggert [215]. In DDM-Mizellen könnten somit ebenfalls *cis*- und *trans*-Oligomere vorliegen, welche die Beobachtung von höheren Oligomeren erklären könnten. Durch eine Erhöhung der DDM-Konzentration könnten die *cis*-Oligomere eventuell (abhängig von der Stärke der Claudin-Interaktion) aufgelöst werden, was Rückschlüsse über den Ablauf der Oligomerisierung erlauben könnte.

Zusammenfassend konnten wie erwartet Claudin-7-Oligomere detektiert werden. Die Größe der Oligomere erscheint realistisch, da Claudin-Hexamere bereits beschrieben wurden und auch höhere Oligomere aufgrund der Oligomerisierung in *cis* und *trans* wahrscheinlich sind.

#### **4.3.10.5 Das Claudin-7 Oligomer ist stabil gegenüber dem Einfluss von SDS, es kommt jedoch zu einer Veränderung der Tryptophan-Umgebung**

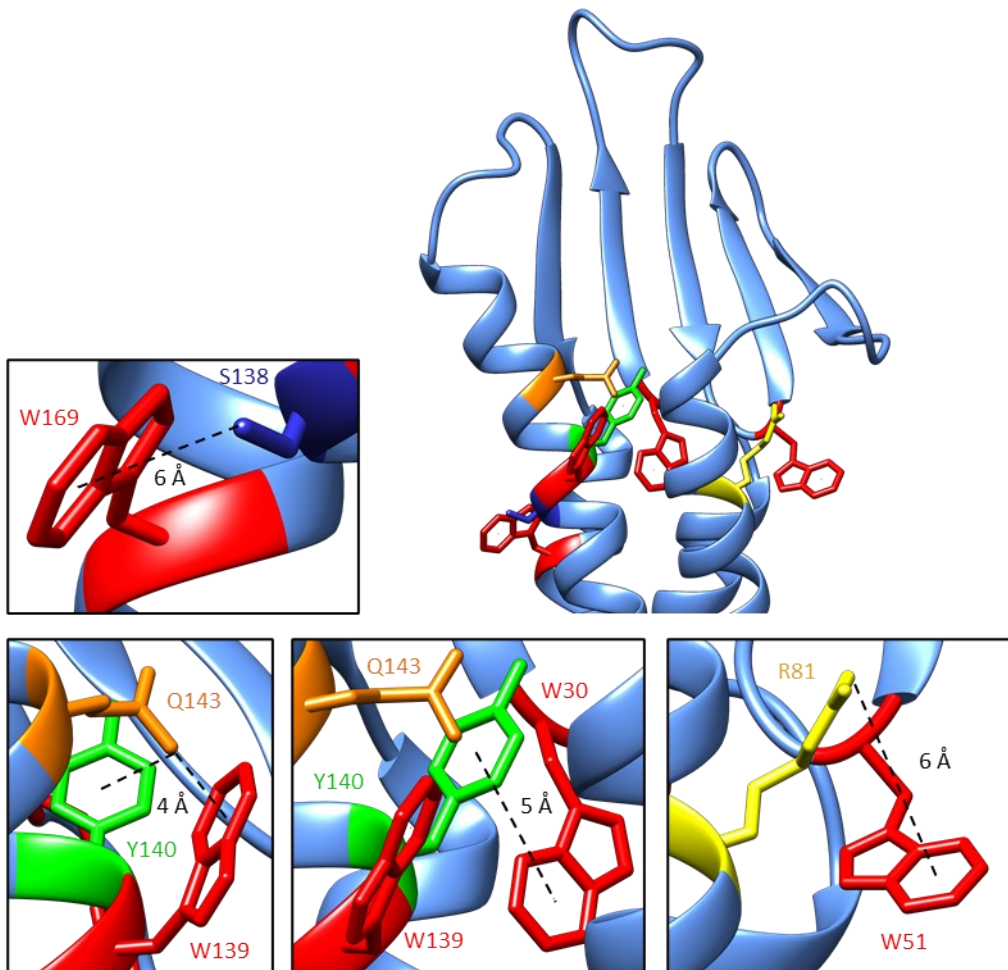
Um Einblicke in die Oligomerisierung, Struktur und Entfaltung von Claudin-7 zu erhalten wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Natriumdodecylsulfat (engl.: *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) auf das Protein untersucht. Dabei wurden die Fluoreszenzeigenschaften von Tryptophan als Sensor seiner Umgebung ausgenutzt. Das heterolog exprimierte Claudin-7 besitzt sechs Tryptophan-Seitenketten, wobei ein Tryptophan im *Strep*-Tag II liegt, einem ungefalteten Bereich. Damit ist eine Veränderung der Umgebung dieses Tryptophans sehr unwahrscheinlich. Vier der weiteren Tryptophan-Seitenketten liegen im Bereich nahe der Lipidkopfgruppen und das fünfte befindet sich im Kern der Lipiddoppelschicht (Abbildung 42). Die Veränderung der Tryptophan-Fluoreszenz wurde bei steigenden SDS-Konzentrationen betrachtet.

Die Tryptophan-Fluoreszenz ist abhängig von der Polarität der Umgebung des Tryptophans. Da das Intensitätsmaximum der gemessenen Tryptophan-Fluoreszenz von Claudin-7 bei  $\lambda = 328$  nm detektiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Tryptophan-Seitenketten in einer vorwiegend hydrophoben Umgebung befinden [216]. Dies entspricht den Erwartungen, da die Tryptophan-Seitenketten im Membranbereich von Claudin-7 lokalisiert sind. Bei steigenden SDS-Konzentrationen konnte ein Abfall der mittleren Wellenlänge  $\langle\lambda\rangle$  um 2 nm beobachtet werden (Abbildung 44). Dies entspricht einer Blauverschiebung des Tryptophan-Spektrums und somit theoretisch einer Exposition der Tryptophan-Seitenketten in eine hydrophobere Umgebung. Bei einer Entfaltung des Proteins wäre allerdings eine Rotverschiebung von  $\langle\lambda\rangle$  aufgrund der Exposition in eine hydrophilere Umgebung zu erwarten gewesen [216]. Eine solche Rotverschiebung konnte bei der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF [217], sowie der thermischen Denaturierung von OmpA [218] beobachtet werden. Demzufolge

wird durch SDS die Struktur des Claudin-7 nicht entfaltet und somit die Tryptophan-Seitenketten nicht in eine hydrophilere Umgebung exponiert. Da sich in der extrazellulären  $\beta$ -Faltblatt-Kopfgruppe kein Tryptophan befindet, kann über die Faltung dieses Bereichs keine Aussage getroffen werden. Informationen hierzu könnten durch CD-spektroskopische Analysen von Claudin-7 in Gegenwart von SDS erhalten werden. Die Interpretation von Tryptophan-Fluoreszenz-Daten ist komplex, da die Umgebung jedes einzelnen Tryptophans einen Einfluss auf das Tryptophan-Spektrum hat [219]. Somit muss die Umgebung aller fünf zentralen Tryptophan-Seitenketten in die Betrachtung der Vorgänge mit einbezogen werden. Dazu wurden besonders geladene und polare Aminosäure-Seitenketten betrachtet, da diese eine mögliche Ursache für die Blauverschiebung des Tryptophan-Spektrums sein können [216]. Es muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der Betrachtung nur um ein Modell von Claudin-7 handelt, welches auf der Kristallstruktur von mClaudin-15 beruht. Somit könnten die betrachteten Aminosäure-Seitenketten in eine andere Richtung weisen als hier angenommen wird. Die infrage kommenden Aminosäure-Seitenketten sind in Abbildung 64 dargestellt.

Mit einem Abstand von etwa 6 Å zum W51 ist mit R81 die einzige geladene Aminosäure in der Nähe eines Tryptophans lokalisiert. Geladene Aminosäuren können eine Verschiebung des Tryptophan-Spektrums um bis zu 6 nm verursachen [216]. Ebenfalls mit einem Abstand von etwa 6 Å liegt S138 zu W169. Polare Seitenketten können eine Blauverschiebung von 5-10 nm verursachen [216], weswegen auch diese Aminosäure als Interaktionspartner in Betracht gezogen werden sollte. Des Weiteren könnte eine Interaktionskette ausgehend von W30 über Y140 (Abstand etwa 5 Å) weiter zu Q143 (Abstand etwa 4 Å) mit Ende bei W139 (Abstand etwa 4 Å) vorliegen. Diese Mischung aus geladenen und aromatischen Seitenketten könnte ebenfalls einen Einfluss auf das Tryptophan-Spektrum haben. Auch wenn der Interaktionswinkel zwischen W30 und Y140 keiner klassischen aromatischen Interaktion entspricht [220], sollte das Tyrosin aufgrund der räumlichen Nähe als Interaktionspartner in Betracht gezogen werden.

Um die Veränderungen des Proteins genauer zu betrachten, sollte zunächst der Einfluss jedes einzelnen Tryptophans auf das gemessene Gesamttryptophan-Spektrum ermittelt werden. Durch Mutation einzelner Tryptophan-Seitenketten könnten genauere Aussagen getroffen werden, in welchem Bereich des Proteins Veränderungen durch SDS verursacht werden. Anschließend könnten dann mögliche Interaktionspartner der Tryptophan-Seitenketten genauer betrachtet werden.



**Abbildung 64: Mögliche Interaktionspartner der Tryptophan-Seitenketten von Claudin-7 im Übergangsbereich zu den Lipidkopfguppen der Membran.**

Dargestellt ist der obere Bereich des Claudin-7-Modells (auf Basis der Kristallstruktur von mClaudin-15, PDB-ID 4P79). Die Tryptophane sind in Rot hervorgehoben. Mögliche Interaktionspartner sind Arginin (R) 81 (gelb), Serin (S) 138 (dunkelblau), Tyrosin (Y) 140 (grün) und Glutamin (Q) 143 (orange).

Des Weiteren wurde der Einfluss des SDS auf die Oligomerisierung mittels SDS-PAGE-Analyse untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass auch bei hohen SDS-Konzentrationen Claudin-7-Oligomere in der SDS-PAGE-Analyse detektiert werden können (siehe Abbildung 43). Wie bereits mittels Gelpermeationschromatographie festgestellt, liegt Claudin-7 in DDM-Mizellen als Monomer und in höheren Oligomeren vor. Auch in den gemischten Mizellen mit SDS scheint keine Dissoziation der Oligomere zu erfolgen. Dies wurde jedoch nicht erwartet, da mit der verwendeten Methode für das Aquaglyceroporin GlpF die Dissoziation vom Tetramer zum Monomer beobachtet werden konnte [209, 217]. Unterschiede zu GlpF lassen sich jedoch bereits in den DDM-Mizellen feststellen. Für GlpF konnten in der seminativen SDS-PAGE-Analyse nur Tetramere detektiert werden [209, 217], während bei Claudin-7 eine Monomer, Dimer und höhere Oligomer-Verteilung beobachtet werden konnte. Die vorliegende Oligomer-Verteilung von Claudin-7 scheint demnach nicht von der Gegenwart von SDS beeinflusst zu werden. Ein weiterer Grund hierfür kann sein, dass SDS auf den Transmembranbereich

von  $\alpha$ -helikalen Membranproteinen stabilisierend wirkt [221–223] und somit die Entfaltung verhindert.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass es in Gegenwart von SDS nicht zu einer Dissoziation der Oligomere kommt und eine Blauverschiebung des Tryptophan-Spektrum hervorgerufen wird. Diese kann diverse Ursachen haben. Zur genaueren Analyse sind weitere Untersuchungen nötig. Die nativ gefaltete Form von Claudin-7 scheint sehr stabil gegenüber dem Einfluss von SDS zu sein.

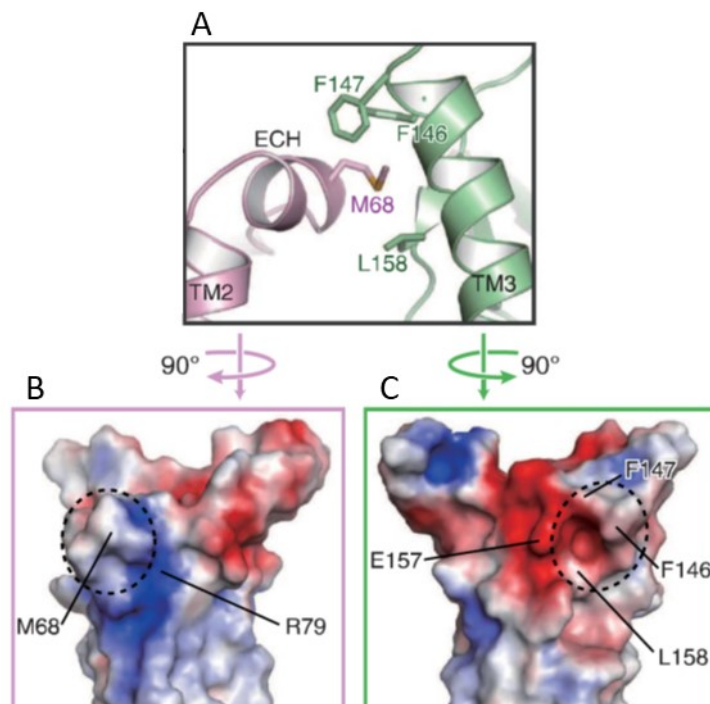
#### **4.3.10.6 Die Claudin-7 Cluster-Bildung wird durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert**

Elektrostatische Wechselwirkungen sind wichtig für die Stabilisierung von Proteinstrukturen, sowohl intra- als auch intermolekular [224]. Durch Veränderung der Ionenstärke, z. B. durch die Veränderung des Salzgehaltes im Puffer, können elektrostatische Wechselwirkungen abgeschirmt oder gefördert werden [225, 226].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Natriumchlorid (NaCl) auf die Cluster-Bildung von Claudin-7 untersucht. Es wurde mit NaCl-Konzentrationen von 0 mM bis 300 mM gearbeitet. Durch Zentrifugation wurde das präzipitierte Protein aus der Lösung entfernt und das Pellet sowie der Überstand analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Claudin-7 in 300 mM NaCl in der solubilisierten Fraktion (Überstand) vorlag (siehe Abbildung 45 A). Dagegen kam es bei 0 mM NaCl zur Cluster-Bildung und weniger als die Hälfte des Claudin-7 konnte in der solubilisierten Fraktion detektiert werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Fehler bei der Betrachtung des präzipitierten Proteins groß sind (siehe Abbildung 45 C). Die Ursachen für diese großen Unterschiede sind divers, so besteht bei der Aufnahme des Pellets in Probenpuffer die Möglichkeit, dass noch Reste des Überstandes in der Probe enthalten waren. In diesem Fall würde dann mehr Protein detektiert, als tatsächlich präzipitiert war. Zu wenig Protein würde dagegen detektiert, wenn bei der Abnahme des Überstandes Teile des Pellets mit abgenommen wurden. Eine weitere Fehlerquelle ist die hohe Stabilität des präzipitierten Proteins, aufgrund dessen das Auflösen in Probenpuffer eventuell nicht vollständig war. Diese diversen Fehlerquellen resultieren in den nicht zu vernachlässigenden Fehlerbalken in Abbildung 45 C. Aufgrund dessen wurde für folgende Untersuchungen mit der SDS-PAGE-Analyse des solubilisierten Proteins gearbeitet.

Auch in der Literatur wurde der Einfluss von Salz, bzw. elektrostatischen Wechselwirkungen auf die Oligomerisierung von Proteinen bereits untersucht. Für die humanen löslichen Rad-Proteine hRad52 und hRad51 konnten bei der Modulation des Salz-Gehaltes im Puffer verschiedene Effekte beobachtet werden [227]. So konnte für hRad52 eine erhöhte Aggregation bei höheren KCl-Konzentrationen

beobachtet werden, während hRad51 analog zu Claudin-7 bei niedriger KCl-Konzentrationen eine erhöhte Aggregation, bzw. Cluster-Bildung zu beobachten war [227]. Durch das Kaliumchlorid wird im Fall von hRad51 die Interaktion über eine intramolekulare Salzbrücke (ionische Wechselwirkung zwischen zwei Aminosäure-Seitenketten) gehemmt. Dass eine erhöhte Ionenstärke in der Lage ist, die Oligomerisierung von Proteinen zu hemmen, wurde auch bereits für die Hexokinase aus *Trypanosoma brucei* gezeigt [228]. Aufgrund dieser Beobachtungen ist es wahrscheinlich, dass das Claudin-7 Oligomer ebenfalls durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert wird. Mögliche Aminosäure-Seitenketten für intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen wurden von Suzuki *et al.* [29] bei der Analyse der Kristallstruktur von mClaudin-15 ermittelt (Abbildung 65). Dabei findet eine Wechselwirkung zwischen R79 und E157 in mClaudin-15 statt. In Claudin-7 entspricht das dem R81 und der E160. Die Mutation dieser Aminosäuren sollte demnach einen Einfluss auf die Cluster-Bildung von Claudin-7 in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen zur Folge haben. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Kapitel 4.3.9.5 beschrieben und werden im Verlauf der Diskussion betrachtet. Dabei scheinen elektrostatische Wechselwirkungen einen stärkeren Einfluss auf die Cluster-Bildung von Claudin-Proteinen zu haben als hydrophobe Wechselwirkungen (gestrichelter Kreis, Abbildung 65), da eine hohe NaCl-Konzentration bei Claudin-7 nicht zu einem hydrophoben Kollaps und somit zu einer Aggregation führt.



**Abbildung 65: Elektrostatische Interaktionsfläche zwischen Claudin-15-Proteinen im mClaudin-15 Kristall (bearbeitet nach [29]).**

(A) Dargestellt sind die Aminosäure-Seitenketten, welche lateral eine Interaktionsfläche in der Kristallstruktur von mClaudin-15 ausbilden. ECH steht dabei für die extrazelluläre Helix (engl.: *extracellular helix*). (B, C) Elektrostatische Potential-Oberfläche des pinken (B) und des grünen Monomers (C). Die blaue Markierung entspricht einer positiven Ladung/Polarisation, die rote Markierung einer negativen Ladung/Polarisation. Der gestrichelte Kreis stellt einen hydrophoben Überstand, bzw. eine hydrophobe Tasche dar.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Cluster-Bildung von Claudin-7 spielen, welche durch die Veränderung der NaCl-Konzentration im Puffer beeinflusst werden konnten.

#### **4.3.10.7 Rekonstituiertes Claudin-7 bildet in Proteoliposomen *trans*-Interaktionen aus**

Die Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen ermöglicht die Untersuchung der Membranproteine in einer kontrollierten Umgebung, die der natürlichen Umgebung jedoch ähnlicher ist als die Detergenzmizelle. In der Literatur ist die Rekonstitution von Claudin-4 mithilfe einer *Infinity Chamber* und *Microfluidic Jetting* beschrieben [155]. Dieses Verfahren ist sehr kompliziert und bedarf spezieller Ausrüstung. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit eine einfache Methode entwickelt, die ohne spezielle Ausrüstung durchgeführt werden kann. Die Rekonstitution von Claudin-7 erfolgte über Detergenzdestabilisierte Liposomen. Diese Methode ist bereits gut in der Literatur beschrieben [137, 229–231] und ermöglichte bereits die Rekonstitution diverser Membranproteine, wie z.B. von ABC-Transporters [136], des spannungsabhängigen Kalium-Kanals KvAP [232, 233] und der spannungsabhängige Domäne von Ci-VSP [234]. Im Fall von Claudin-4 wurde das Lipid Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC) [155] verwendet, welches chemisch stabiler ist als natürliche Lipide [235]. In dieser Arbeit wurde als Lipid für die Liposomen das zwitterionische Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) verwendet. Phosphatidylcholine (PC) sind ein Hauptbestandteil von eukaryotischen Plasmamembranen [14, 236]. Zunächst wurde in dieser Arbeit bestimmt, wie sich die Stabilität von DOPC-Liposomen bei steigender Konzentration von Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) verhält (Abbildung 46). Dadurch konnte die LDAO-Konzentration bestimmt werden, bei der die Liposomen (1,5 mg/mL DOPC) mit Detergenz gesättigt ( $R_{\text{sat}} = 4,5 \text{ mM}$ ) sind und bei welchem die Liposomen vollständig in Detergenz solubilisiert sind ( $R_{\text{sol}} = 9 \text{ mM}$ ). Im Bereich zwischen diesen beiden Konzentrationen spricht man von destabilisierten Liposomen, welche für die Rekonstitution von Claudin-7 benötigt werden. Der Erfolg der Rekonstitution konnte mittels Saccharose-Gradient nachgewiesen werden (Abbildung 47), da eine Co-Lokalisation von Claudin-7 mit den Liposomen nachgewiesen wurde. Über einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradient konnte ebenfalls die Rekonstitution des Transporters PcaK aus *Acinetobacter sp. ADP1* nachgewiesen werden [138]. Somit konnte in dieser Arbeit ein Protokoll für die erfolgreiche Rekonstitution von Claudin-7 in DOPC-Liposomen etabliert werden.

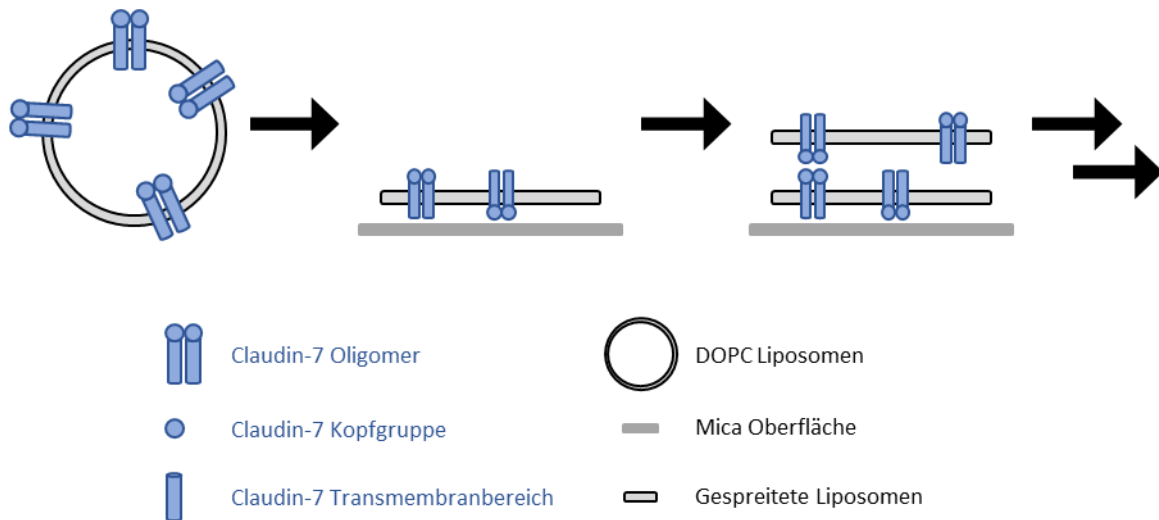
Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Messungen sind eine weitverbreitete Methode in der Biochemie, um Interaktionen, Proteinstrukturveränderungen und vieles mehr zu untersuchen [147]. Dabei ist eine Voraussetzung, dass der Abstand zwischen Fluoreszenz-Donor und Akzeptor nicht zu groß ist. Der Abstand, bei welchem der Energietransfer mit einer 50 %igen Effizienz stattfindet, wird

Förster Radius genannt, wobei für die Untersuchungen von biologischen Systemen üblicherweise Abstände von 20 – 90 Å betrachtet werden [147, 154]. Für die Analyse der *cis*-Interaktion von Claudin-Proteinen *in vivo* konnte bereits ein FRET-basierter Assay etabliert werden [215, 237, 238]. *In vitro*-Untersuchungen von Belardi *et al.* konnten für Claudin-4 eine Verknüpfung von GUVs (engl.: *Giant unilamellar vesicles*) mit einem Abstand kleiner als 5 nm feststellen [155]. Aufgrund der Nähe der Liposomen sollte mit dem hier entwickelten FRET-Assay (Methodenteil Kap. 3.5.2, Ergebnisteil Kap. 4.3.7.3, Abbildung 14) gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkierte Lipide in den Proteoliposomen ein FRET-Paar ausbilden können, wenn sie durch *trans*-Interaktion von Claudin-7 in räumliche Nähe gebracht werden. Diese Erwartung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (vgl. Abbildung 48). Damit wurde gezeigt, dass rekonstituiertes Claudin-7 *in vitro trans*-Interaktionen ausbildet, was zu einer Verknüpfung der Proteoliposomen geführt hat. Dies ermöglicht weitere Untersuchungen dieser Interaktion. So könnte z.B. betrachtet werden, mit welchen anderen Claudin-Proteinen Claudin-7 *trans*-Interaktionen ausbilden kann. Des Weiteren könnte analysiert werden, wie sich z.B. der Salzgehalt auf die Kopf-zu-Kopf-Interaktion auswirkt. Die Etablierung eines FRET basierten Assays ist demnach ein wichtiger Schritt hin zum Verständnis der *trans*-Interaktion von Claudin-7.

#### **4.3.10.8 Die *trans*-Interaktion von rekonstituierten Claudin-7 konnte mittels Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden**

Rasterkraftmikroskopie (engl.: *Atomic force microscopy*, AFM) ermöglicht die Untersuchung von Membranproteinen in einer natürlichen Umgebung, das heißt sowohl die Betrachtung von ganzen Zellen als auch von isolierten Membranproteinen in Lipiddoppelschichten unter physiologischen Bedingungen [159]. Dabei müssen diese nicht markiert werden und es kann mit Puffern gearbeitet werden, welche physiologische Bedingungen widerspiegeln [239]. So konnte die Interaktion zwischen dem Thrombozyten Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und seinem Liganden Fibrinogen mittels AFM untersucht werden [240]. Ebenfalls konnte die Tetramer-Struktur von rekonstituiertem AQP0 aus Schafen, mittels AFM mit hoher Auflösung abgebildet werden [241]. Diese Beispiele zeigen, dass AFM-Aufnahmen Rückschlüsse über Struktur und Interaktion von Membranproteinen erlauben. Für Claudin-Proteine wurde bisher nur eine Variante des AFM, die *Single-Molecule Force Spectroscopy* verwendet, welche Rückschlüsse über die Stabilität der Struktur von Proteinen erlaubt [242–244]. In dieser Arbeit wurde in Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen rekonstituiertes Claudin-7 mittels AFM betrachtet. Dabei konnten im Unterschied zu reinen DOPC-Membranen, Membranstapel mit unterschiedlichen Höhen beobachtet werden. Diese weisen darauf hin, dass es durch Claudin-7 zu einer Vernetzung der gespreiteten Liposomen kommt. Es konnten Stapel von bis zu sechs Lipid-Doppelschichten beobachtet werden (vgl. Abbildung 50). Das Auftreten dieser Stapel lässt sich mit der ungerichteten Insertion von

Claudin-7 in die Proteoliposomen erklären. Diese ermöglicht, dass stets eine weitere Doppelschicht auf der vorherigen gespreiteten werden kann (vgl. Abbildung 66). Eine weitere Voraussetzung für die Ausbildung der Stapel ist die Interaktion der Claudin-7 Proteine. Dabei handelt es sich um *trans*-Interaktionen zwischen den  $\beta$ -Faltblatt-Kopfgruppen der Claudin-7 Proteine. Damit konnte nachgewiesen werden, dass rekombinantes Claudin-7 *in vitro* seine natürliche Funktion ausbildet.



**Abbildung 66: Model der Spreitung von Claudin-7 Proteoliposomen auf einer Mica-Oberfläche.**

Aufgrund der ungerichteten Insertion von Claudin-7 in die Proteoliposomen kommt es zur Ausbildung von Lipiddoppelschicht-Stapeln.

Um Rückschlüsse auf die Art der Interaktion zwischen den Claudin-Proteinen zu erhalten, wurden die Claudin-7 Proteoliposomen in der Abwesenheit von NaCl betrachtet. Dies führte in der Mizellen-Umgebung zu einer Clusterung der Claudin-7 Proteine (siehe Kap. 4.3.6, Abbildung 45). Dahingegen konnte bei der Betrachtung der gespreiteten Proteoliposomen mittels AFM keine Veränderung beobachtet werden. Auch ohne Salz bilden sich die bereits beobachteten Stapel aus. Auch in der Anzahl dieser Stapel konnte kein Unterschied beobachtet werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die *trans*-Interaktionen nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert werden. Für verschiedene Claudine wurden hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten des zweiten extrazellulären Loops beobachtet [215, 245–248]. Durch Mutationen der entsprechenden Aminosäuren könnte somit erreicht werden, dass sich keine Stapel aus gespreiteten Proteoliposomen mehr ausbilden. Dies würde zusätzliche Informationen über die *trans*-Interaktion von Claudin-7 liefern.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit AFM-Aufnahmen der Claudin-7 Oligomere aufgenommen werden (Abbildung 53 B). Dabei wurde ein 20-40 nm großer Ring mit einer Randbreite von 6-7 nm identifiziert, der dem Claudin-7 Oligomer zuzuordnen ist. Die Claudin-7 Kopfgruppe besitzt in etwa einen Durchmesser von 3 nm. Dies wurde auf Basis des Strukturmodells, basierend auf der mClaudin-15 Kristallstruktur, mittels des Programms Chimera [146] bestimmt. Unter Einbeziehung der

Messungengenauigkeiten besteht die Möglichkeit, dass der Ring aus einer bis drei Schichten Claudin-7 besteht. Um genauere Aussagen treffen zu können, sind exaktere Methoden, wie zum Beispiel Elektronenmikroskopie oder eine AFM-Messung bei niedrigerer Scanrate, mit kleinerer Spitze und eine rauschärmere Umgebung nötig.

Durch AFM-Messungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass rekombinantes Claudin-7 *trans*-Interaktionen ausbildet. Dabei konnte das Claudin-7-Oligomer in ringförmig Struktur detektiert werden.

#### **4.3.10.9 Analyse der Claudin-7 Oligomerisierung durch gezielte Mutation von Aminosäure-Seitenketten**

Gezielte Mutationen von Aminosäure-Seitenketten ermöglichen es, deren Einfluss auf die Funktion und Struktur von Proteinen zu untersuchen. Auch die Interaktion mit anderen Proteinen oder der Membran können durch gezielte Mutationen genauer analysiert werden. Diese Methode ist weit verbreitet und ermöglichte zum Beispiel im Fall von Transthyretin und dem Retinol-bindenden Protein die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen [249]. Des Weiteren können durch Mutationsanalysen auch Erkenntnisse über die Insertion von Transmembransegmenten und deren Selbst-Assoziation gewonnen werden [250]. Zusätzlich können durch Einfügen oder Entfernen von Tryptophan-Seitenketten die Veränderungen in der lokalen Umgebung des Tryptophans beobachtet werden und ermöglichen damit Rückschlüsse auf die Stabilität einer Struktur oder die Interaktion mit anderen Aminosäure-Seitenketten. Dies wurde bei dem Protein GlpF verwendet, um Einblicke in die Entfaltung des Proteins zu erhalten [217]. In dieser Arbeit wurden gezielte Aminosäure-Seitenketten zu Alanin mutiert, um deren Einfluss auf die Oligomerisierung von Claudin-7 zu analysieren. Die Auswahl der Aminosäure-Seitenketten erfolgte auf Grundlage der Kristallstruktur von mClaudin-15 und der von Suzuki *et al.* [29] prognostizierten Aminosäure-Seitenketten, welche für die Interaktion in der Ebene der Membran (*cis*-Interaktion) verantwortlich sind. Als ungeladene und kleine Aminosäure wurde Alanin für die Mutationen verwendet. Die zu Alanin mutierten Aminosäuren im Claudin-7 sind: V70, R81, F148, Y149, E160 und F161 (vgl. Abbildung 54). Es wurden sowohl Einfach-Mutanten der einzelnen Aminosäure-Seitenketten betrachtet als auch eine Mutante mit der Mutation aller sechs Aminosäure-Seitenketten (Claudin-7\*). Laut Suzuki *et al.* [29] können bereits mit der Mutation von R81, F148 und Y149 keine *tight junction*-Stränge mehr ausgebildet werden, weswegen auch eine Mutante mit diesen drei mutierten Aminosäure-Seitenketten (Claudin-7') hergestellt wurde. Zusätzlich wurde die zweifache Mutante der beiden Aminosäure-Seitenketten R81 und Y149 betrachtet.

Analog zum wildtypischen Claudin-7 wurde auch mit den hergestellten Claudin-7 Mutanten das GALLEX-Experiment zur Detektion der *in vivo*-Dimerisierung durchgeführt. Die Einschränkungen dieses Experiments im Fall von Claudin-7 wurden bereits diskutiert (siehe Kap. 4.3.10.1). Wie bereits für Claudin-7 konnte auch für die untersuchten Mutanten nur eine mäßige Dimerisierung beobachtet werden (Abbildung 55). Bei Betrachtung des Expressionsniveaus fällt auf, dass dieses stark variiert. Dies führt bei Einbezug in die  $\beta$ -gal *units* zu großen Fehlerbalken. Jedoch auch bei Beachtung des Expressionsniveaus konnte lediglich für die sechsfache Mutante Claudin-7\* eine geringfügig verbesserte Dimerisierung beobachtet werden. Dies entspricht nicht den Erwartungen, da die Mutation der oben genannten Aminosäure-Seitenketten zu einer verringerten Oligomerisierung führen sollte. Die anschließenden *in vitro* Untersuchungen sollten genauere Rückschlüsse über den Einfluss der Mutationen ermöglichen.

Die Expression und Reinigung der Claudin-7 Mutanten erfolgte analog zum Claudin-7 Wildtyp (Abbildung 56, Abbildung 89, Abbildung 90, Abbildung 91). Alle Mutanten konnten dabei erfolgreich exprimiert und in einem ähnlichen Reinheitsgrad und einer vergleichbaren Ausbeute zum Wildtyp hergestellt werden. Auch konnte für alle Mutanten in der SDS-PAGE-Analyse das Muster aus Monomer-, Dimer- und höheren Oligomerbanden detektiert werden. Dies spricht dafür, dass die Mutationen nicht zu einer deutlichen Strukturänderungen geführt haben und keine Fehlfaltungen vorliegen, da ansonsten eine Anreicherung in Einschlusskörperchen zu beobachten wäre [181], bzw. weniger Claudin in der Membranfraktion detektiert würde. Das in der SDS-PAGE-Analyse dasselbe Bandenmuster wie für den Wildtyp detektiert wurde spricht dafür, dass die Oligomerisierung in *trans* (Oligomerisierung über die  $\beta$ -Faltblatt-Kopfgruppe) nicht durch die Mutationen beeinflusst wurde. Des Weiteren wurden von Zhao *et al.* [187] unterschiedliche Interaktionsflächen (siehe Kap. 4.3.10.1) publiziert. Diese könnten eine weitere Oligomerisierung der Mutanten erklären.

Zur genaueren Analyse der Sekundärstruktur wurden von allen Mutanten CD-Spektren aufgenommen und mit dem Spektrum des Wildtyps verglichen (Abbildung 57). Dabei konnten keine Unterschiede in der Sekundärstruktur beobachtet werden. Neben der Betrachtung mit BESTSEL [196] wurde ebenfalls das Verhältnis der Elliptizität bei 222 nm zu 208 nm betrachtet. Dies gibt Auskunft, ob eine  $\alpha$ -Helix in einer *coiled coil* Form oder isoliert vorliegt [251]. Auch dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Claudin-7 Wildtyp detektiert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Mutanten in wildtypischer Sekundärstruktur vorliegen und die Ergebnisse weiterer Untersuchungen nicht auf strukturellen Unterschieden der Proteine beruhen.

#### **4.3.10.9.1 Claudin-7\* weist eine geringere thermische Stabilität als der Wildtyp auf, während die Stabilität gegenüber SDS unverändert bleibt**

Zunächst wurde die thermische Stabilität der Sekundärstruktur von Claudin-7\* im Vergleich zum Wildtyp betrachtet. Es konnte analog zum Wildtyp festgestellt werden, dass keine vollständige Entfaltung der Sekundärstruktur bei 95 °C vorliegt (Abbildung 58). Der Vergleich der Elliptizität bei 219 nm ergibt einen ähnlichen Kurvenverlauf, jedoch ist der Wendepunkt für Claudin-7\* mit  $57,3 \text{ °C} \pm 1,1 \text{ °C}$  um  $2,4 \text{ °C}$  niedriger als der des Wildtyps. Somit weist die Sekundärstruktur eine verringerte thermische Stabilität auf. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Durch die veränderten Aminosäure-Seitenketten könnten intramolekulare Wechselwirkungen verändert worden sein, was die verminderte thermische Stabilität zur Folge hätte. Die eingebrachten Mutationen sollten einen Einfluss auf die Oligomerisierung [29, 100, 187, 245] und somit auf die intermolekularen Wechselwirkungen haben. Dies könnte einen Einfluss auf die Stabilität der Sekundärstruktur haben. Da die Sekundärstruktur von Claudin-7\* bei Raumtemperatur mit der des Wildtyps vergleichbar ist, kann die verminderte thermische Stabilität vermutlich durch die verminderten intermolekularen Wechselwirkungen begründet werden und wurde demnach erwartet. Hierfür spricht ebenfalls, dass Claudin-7\* unter Einfluss von steigenden SDS-Konzentrationen ein ähnliches Verhalten wie der Wildtyp aufweist (Abbildung 59). Die Veränderung des Tryptophan-Spektrums von Claudin-7\* unter Einfluss von SDS ist analog zum Claudin-7 Wildtyp. Somit wurden intramolekulare Wechselwirkungen durch die Mutation der sechs Aminosäureseitenketten nicht beeinflusst. Dies spricht wiederum dafür, dass die verminderte thermische Stabilität ihren Ursprung in intermolekularen Wechselwirkungen hat, welche durch die Mutationen gestört wurden. Da Claudin-7\* in der SDS-Titration keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist, wurde für die Einzelmutationen ebenfalls kein Unterschied erwartet. Dies konnte bestätigt werden (Abbildung 93, Abbildung 94, Abbildung 95, Abbildung 96).

Eine thermische Denaturierung der Einzelmutanten könnte zusätzliche Informationen darüber liefern, ob erst die Kombination der sechs Aminosäure-Seitenketten zu der veränderten Stabilität führen oder diese bereits durch eine einzelne veränderte Seitenkette auftreten kann.

#### **4.3.10.9.2 Die intermolekularen Wechselwirkungen on Claudin-7 werden durch die Mutation von R81 bzw. Y149 verringert und sind bei Claudin-7\* nicht nachweisbar**

Zur weiteren Analyse des Einflusses der mutierten Aminosäure-Seitenketten wurde die Auswirkung auf die elektrostatischen Wechselwirkungen analog zum Claudin-7 Wildtyp betrachtet. Die Anteile an solubilisiertem Protein konnten anschließend verglichen werden. Die Cluster-Bildung von Claudin-7\* wurde dabei nicht von der NaCl-Konzentration beeinflusst (Abbildung 60). Dies liegt vermutlich daran, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen durch die Mutationen

verhindert wurden. Die Analyse der Einzelmutationen sollte anschließend den Einfluss der einzelnen Aminosäure-Seitenketten genauer charakterisieren (Abbildung 60). Die Einzelmutationen V70A, F148A, E160A und F161A liegen analog zum Wildtyp bei einer NaCl-Konzentration von 0 mM nur noch zu etwa 40 % in der solubilisierten Fraktion vor. Diese Mutationen haben demnach keinen Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Claudin-7 Proteinen. Dahingegen zeigte die Mutation der Aminosäure-Seitenketten R81 und Y149 eine verringerte Präzipitation der Claudin-7 Proteine. Diese Seitenketten spielen demnach eine Rolle bei der Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen. Ob diese Effekte additiv sind oder daher resultieren, dass diese beiden Aminosäure-Seitenketten miteinander interagieren, sollte mithilfe einer Doppelmutation dieser beiden Aminosäure-Seitenketten betrachtet werden. Die Cluster-Bildung dieser Mutante ist mit der der Einzelmutationen von R81 bzw. Y149 vergleichbar (Abbildung 60). Somit sind die detektierten Effekte nicht additiv, was dafürspricht, dass diese beiden Aminosäure-Seitenketten miteinander interagieren. Dies legt auch die Interaktion in der ermittelte Kristallstruktur von Claudin-15 nahe [29]. Auch die Dreifachmutante von R81, F148 und Y149 weist eine ähnliche Cluster-Bildung bei verringerter NaCl-Konzentration auf wie die Einfachmutationen von R81 bzw. Y149. Somit hat die Mutation von F148 auch in Kombination mit der Mutation von R81 und Y149 keinen Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen. Bei der Mutante Claudin-7\* konnte dahingegen keine Cluster-Bildung bei verringerter Salz-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 60). Somit spielen die elektrostatischen Wechselwirkungen, welche beim wildtypischen Protein zur Cluster-Bildung führen, bei Claudin-7\* keine Rolle. Da die Aminosäure-Seitenketten R81 und Y149 jedoch nur eine Verringerung des Effekts um etwa 20 % bewirken und in Kombination mit F148 keine weitere Verringerung auftritt, ist vermutlich einer der anderen drei Aminosäure-Seitenketten für die komplette Reduktion verantwortlich. Dabei ist zu beachten, dass die Einzelmutanten dieser Seitenketten keinerlei Effekt auf die Cluster-Bildung aufweisen. Eine Kombination mit R81 oder Y149 könnte Einsichten liefern, mit welcher weiteren Aminosäure-Seitenkette eine Cluster-Bildung vollständig unterdrückt würde. Für mClaudin-3 konnte gezeigt werden, dass *in vivo* eine deutlich veränderte Morphologie bei der Mutation von L70 (V70 in Claudin-7) zu beobachten war [215]. Diese Aminosäure-Seitenkette wurde ebenfalls von Suzuki *et al.* [29] als wichtig für die *cis*-Interaktion proklamiert. Auch Alberini *et al.* [245] konnten die Interaktion dieser Aminosäure-Seitenkette mit den Aminosäure-Seitenketten F146, F147 und L158 in mClaudin-15 (analog in Claudin-7: F148, Y149 und F161) nachweisen. Diese Interaktion beruht vermutlich auf hydrophoben Wechselwirkungen [215] und kann deshalb mittels dieses Experiments nicht nachgewiesen werden. Die konservierte Aminosäure-Seitenkette E160 in Claudin-7 spielt eine wichtige Rolle bei der *cis*-Oligomerisierung von Claudin-5 [247] und ist in mClaudin-15 Teil einer Salzbrücke [187]. Die Mutation dieser Aminosäure-Seitenkette zeigte jedoch wider Erwarten keinen Einfluss auf die Cluster-Bildung von Claudin-7. Die

Salzbrücke bildet sich in mClaudin-15 zwischen E157 und R79 [187]. Im Fall von Claudin-7 konnte jedoch eine Interaktion des R81 mit Y149 nachgewiesen werden. Möglicherweise ist diese Bindung stärker als die Bindung zu E160, weswegen der Verlust von E160 nicht zu einer veränderten Cluster-Bildung führt. Weiter Untersuchungen könnten klären, ob eine Mutation dieser drei Aminosäure-Seitenketten zu der nicht beobachteten Cluster-Bildung in Claudin-7\* führt. Die Seitenkette Y161 aus Claudin-7 ist in mClaudin-3 [215] und mClaudin-15 [29, 245] Teil einer hydrophoben Tasche. Diese Wechselwirkungen können durch das durchgeführte Experiment nicht beobachtet werden. Weitere Analysen der Interaktion zwischen den Aminosäure-Seitenketten werden in Zukunft genauere Aussagen über die Art der Interaktion erlauben.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass durch die Mutation der Aminosäure-Seitenketten V70, R81, F148, Y149, E160 und Y161 die Cluster-Bildung von Claudin-7 ohne die Gegenwart von NaCl gehemmt ist. Des Weiteren konnte durch Einzelmutationen die Interaktion von R81 mit Y149 nachgewiesen werden.

#### **4.3.10.9.3 Die *trans*-Interaktion von Claudin-7 wird nicht durch die Aminosäure-Seitenketten V70, R81, F148, X149, E160 und Y161 beeinflusst**

Zur Untersuchung der *trans*-Interaktion von Claudin-7\* wurde dieses ebenfalls in Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)-Liposomen rekonstituiert. Nach erfolgreicher Rekonstitution konnte die Kopf-zu-Kopf-Interaktion von Claudin-7\* sowohl mittels des vorgestellten FRET-Experimentes (siehe Kap. 4.3.9.6) als auch mittels Rasterkraftmikroskopie (engl.: *Atomic force microscopy*, AFM) (siehe Kap. 4.3.9.7) betrachtet werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Kopf-zu-Kopf-Interaktion von Claudin-7\* nicht von der des Wildtyps zu unterscheiden ist (Abbildung 61, Abbildung 62). Dies entspricht den Erwartungen, da die mutierten Aminosäure-Seitenketten in der *cis*-Interaktion involviert sein sollten [100]. Die *cis*-Interaktion von Claudin-7\* konnte nicht mittels AFM untersucht werden, da keine Aufnahmen mit einer entsprechend guten Auflösung angefertigt werden konnten. Die relevanten Aminosäure-Seitenketten für die *trans*-Interaktion sind vermutlich in den variablen Bereichen der extrazellulären Bereiche V1 und V2 lokalisiert [252]. So wurden von Hempel *et al.* [215] für Claudin-3 und -10 die Aminosäure-Seitenketten im Bereich von Aminosäure 31 bis 46 für die *trans*-Interaktion vorgeschlagen. Diese bilden laut Alberini *et al.* [245] Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die durch die variable Region V2, auf dem extrazellulären Bereich, ausgebildeten Wechselwirkungen haben einen hydrophoben Charakter [244, 245]. Dabei wurden für Claudin-5 die Reste F147, Y148, Q156, Y158 und E159 als für die *trans*-Interaktion wichtig identifiziert [247, 248]. Es fallen besonders die Reste F147, Y148 und E159 auf, da die analogen Aminosäure-Seitenketten des Claudin-7 in dieser Arbeit mutiert wurden. Sie führten auch in Kombination nicht zu einer veränderten *trans*-Interaktion.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Interaktion über V1 ausreicht, um Kopf-zu-Kopf-Verknüpfungen auszubilden. Eine andere Möglichkeit ist, dass diese Reste in Claudin-7 keine besondere Rolle bei der *trans*-Interaktion spielen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da diese Aminosäure-Seitenketten in allen Claudin-Proteinen hoch konserviert sind. Zum besseren Verständnis der *trans*-Interaktion von Claudin-7 sind weiterreichende Untersuchungen nötig, welche dann einen genaueren Einblick in die vorliegenden Wechselwirkungen geben sollten. So könnten durch Mutation, der im Bereich V1 und V2 publizierten wichtigen Aminosäure-Seitenketten, die Seitenketten identifiziert werden, bei welchen keine *trans*-Interaktion mehr zu beobachten ist. Die dazu nötigen Experimente konnten in dieser Arbeit etabliert werden. Des Weiteren kann mit den vorgestellten Experimenten der Einfluss verschiedenster Substanzen auf die Ausbildung von *tight junctions* untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Claudin-7 *cis*-Interaktion durch Interaktion der Aminosäure-Seitenketten V70, R81, F148, Y149, E160 und Y161 beeinflusst ist. Dabei ist die Interaktion zwischen R81 und Y149 hervorzuheben. Die *trans*-Interaktion von Claudin-7 wurde durch die Mutation dieser Aminosäure-Seitenketten nicht beeinflusst.

## 5 Literatur

1. Watson H (2015) Biological membranes. *Essays Biochem* 59:43–69. doi:10.1042/bse0590043
2. Tiefenauer L, Demarche S (2012) Challenges in the Development of Functional Assays of Membrane Proteins. *Materials* 5(11):2205–2242. doi:10.3390/ma5112205
3. Fagerberg L, Jonasson K, Heijne G von, Uhlén M, Berglund L (2010) Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics* 10(6):1141–1149. doi:10.1002/pmic.200900258
4. Heijne G von (2007) The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J Intern Med* 261(6):543–557. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01792.x
5. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL, Häcker B (2009) *Lehninger Biochemie*. Mit 131 Tabellen, 4. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin
6. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* 41(1):66–97. doi:10.1016/s0163-7827(01)00020-0
7. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2018) *Stryer Biochemie*, 8. Aufl. Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin
8. Goluszko P, Nowicki B (2005) Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells. *Infect Immun* 73(12):7791–7796. doi:10.1128/IAI.73.12.7791-7796.2005
9. Symons JL, Cho K-J, Chang JT, Du G, Waxham MN, Hancock JF, Levental I, Levental KR (2020) Lipidomic atlas of mammalian cell membranes reveals hierarchical variation induced by culture conditions, subcellular membranes, and cell lineages. *Soft Matter*. doi:10.1039/d0sm00404a
10. Barák I, Muchová K (2013) The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int J Mol Sci* 14(2):4050–4065. doi:10.3390/ijms14024050
11. Kutschera U, Niklas KJ (2005) Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci* 124(1):1–24. doi:10.1016/j.thbio.2005.04.001
12. Kobayashi K (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129(4):565–580. doi:10.1007/s10265-016-0827-y
13. Wunderlich F, Fiebig S, Vial H, Kleinig H (1991) Distinct lipid compositions of parasite and host cell plasma membranes from *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44(2):271–277. doi:10.1016/0166-6851(91)90013-V
14. Casares D, Escribá PV, Rosselló CA (2019) Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* 20(9). doi:10.3390/ijms20092167
15. Gruner SM (1985) Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(11):3665–3669. doi:10.1073/pnas.82.11.3665
16. Seddon JM (1990) Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1031(1):1–69. doi:10.1016/0304-4157(90)90002-t
17. Janmey PA, Kinnunen PKJ (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* 16(10):538–546. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.009
18. White SH, Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319–365. doi:10.1146/annurev.biophys.28.1.319
19. Koynova R, Caffrey M (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1376(1):91–145. doi:10.1016/s0304-4157(98)00006-9

20. Lewis RNAH, McElhaney RN (2013) Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828(10):2347–2358. doi:10.1016/j.bbamem.2012.10.018
21. Bagatolli LA, Mouritsen OG (2013) Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front Plant Sci* 4:457. doi:10.3389/fpls.2013.00457
22. Lingwood D, Kaiser H-J, Levental I, Simons K (2009) Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 5):955–960. doi:10.1042/BST0370955
23. Lodish H (2000 (2001 printing)) *Molecular cell biology*, 4. Aufl. Media connected. W.H. Freeman, New York
24. Luckey M (2008) *Membrane Structural Biology*. Cambridge University Press, Cambridge
25. Ulmschneider MB, Sansom MSP (2001) Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1512(1):1–14. doi:10.1016/s0005-2736(01)00299-1
26. Tamm LK, Hong H, Liang B (2004) Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666(1-2):250–263. doi:10.1016/j.bbamem.2004.06.011
27. BUCHANAN S (1999)  $\beta$ -Barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Current Opinion in Structural Biology* 9(4):455–461. doi:10.1016/S0959-440X(99)80064-5
28. Scott DL, Otwinowski Z, Gelb MH, Sigler PB (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* 250(4987):1563–1566. doi:10.1126/science.2274788
29. Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y (2014) Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* 344(6181):304–307. doi:10.1126/science.1248571
30. Pautsch A, Schulz GE (1998) Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol* 5(11):1013–1017. doi:10.1038/2983
31. Chen H, Kendall DA (1995) Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem* 270(23):14115–14122. doi:10.1074/jbc.270.23.14115
32. Rost B, Casadio R, Fariselli P, Sander C (1995) Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci* 4(3):521–533. doi:10.1002/pro.5560040318
33. Heijne G (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* 5(11):3021–3027
34. Engelman DM, Chen Y, Chin C-N, Curran AR, Dixon AM, Dupuy AD, Lee AS, Lehnert U, Matthews EE, Reshetnyak YK, Senes A, Popot J-L (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Letters* 555(1):122–125. doi:10.1016/S0014-5793(03)01106-2
35. Neumann J, Klein N, Otzen DE, Schneider D (2014) Folding energetics and oligomerization of polytopic  $\alpha$ -helical transmembrane proteins. *Arch Biochem Biophys* 564:281–296. doi:10.1016/j.abb.2014.07.017
36. Jähnig F (1983) Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(12):3691–3695. doi:10.1073/pnas.80.12.3691
37. Lemmon MA, Engelman DM (1994) Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *FEBS Letters* 346(1):17–20. doi:10.1016/0014-5793(94)00467-6
38. Eriksson AE, Baase WA, Zhang XJ, Heinz DW, Blaber M, Baldwin EP, Matthews BW (1992) Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. *Science* 255(5041):178–183. doi:10.1126/science.1553543

39. Cymer F, Veerappan A, Schneider D (2012) Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818(4):963–973. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.035
40. Schneider D (2004) Rendezvous in a membrane: close packing, hydrogen bonding, and the formation of transmembrane helix oligomers. *FEBS Letters* 577(1-2):5–8. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.029
41. Ulmschneider MB, Sansom MSP, Di Nola A (2005) Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* 59(2):252–265. doi:10.1002/prot.20334
42. Wimley WC, Creamer TP, White SH (1996) Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochemistry* 35(16):5109–5124. doi:10.1021/bi9600153
43. Andersen OS, Koeppe RE (2007) Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:107–130. doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132643
44. Killian JA (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1376(3):401–416. doi:10.1016/s0304-4157(98)00017-3
45. Lee AG (1998) How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. *Biochimica et Biophysica Acta* 1376(3):381–390. doi:10.1016/s0304-4157(98)00010-0
46. Jesus AJ de, Allen TW (2013) The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828(2):864–876. doi:10.1016/j.bbamem.2012.09.009
47. Ridder A, Skupjen P, Unterreitmeier S, Langosch D (2005) Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol* 354(4):894–902. doi:10.1016/j.jmb.2005.09.084.
48. Ridder ANJA, van de Hoef W, Stam J, Kuhn A, Kruijff B de, Killian JA (2002) Importance of hydrophobic matching for spontaneous insertion of a single-spanning membrane protein. *Biochemistry* 41(15):4946–4952. doi:10.1021/bi0158674
49. Järvi S, Gollan PJ, Aro E-M (2013) Understanding the roles of the thylakoid lumen in photosynthesis regulation. *Front Plant Sci* 4:434. doi:10.3389/fpls.2013.00434
50. Mullineaux CW (2014) Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837(4):503–511. doi:10.1016/j.bbabi.2013.11.017
51. Trissl H-W, Wilhelm C (1993) Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends in Biochemical Sciences* 18(11):415–419. doi:10.1016/0968-0004(93)90136-B
52. Mareš J, Strunecký O, Bučinská L, Wiedermannová J (2019) Evolutionary Patterns of Thylakoid Architecture in Cyanobacteria. *Front Microbiol* 10:277. doi:10.3389/fmicb.2019.00277
53. Simidjiev I, Stoylova S, Amenitsch H, Javorfi T, Mustardy L, Laggner P, Holzenburg A, Garab G (2000) Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(4):1473–1476. doi:10.1073/pnas.97.4.1473
54. Chigri F, Fuchs M, Otters S, Vothknecht UC (2012) Thylakoid membrane formation: Vipp1 and more. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*:6–10
55. Armbruster U, Labs M, Pribil M, Viola S, Xu W, Scharfenberg M, Hertle AP, Rojahn U, Jensen PE, Rappaport F, Joliot P, Dörmann P, Wanner G, Leister D (2013) Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *Plant Cell* 25(7):2661–2678. doi:10.1105/tpc.113.113118

56. Heinz S, Rast A, Shao L, Gutu A, Gügel IL, Heyno E, Labs M, Rengstl B, Viola S, Nowaczyk MM, Leister D, Nickelsen J (2016) Thylakoid Membrane Architecture in *Synechocystis* Depends on CurT, a Homolog of the Grana CURVATURE THYLAKOID1 Proteins. *Plant Cell* 28(9):2238–2260. doi:10.1105/tpc.16.00491
57. Heinz S, Pade N, Hagemann M, Nickelsen J (2016) CurT contributes to osmotic stress tolerance in *Synechocystis* independent of compatible solutes. *Endocytobiosis and Cell Research* 27(3):52–55
58. Luque I, Ochoa de Alda JAG (2014) CURT1, CAAD-containing aaRSs, thylakoid curvature and gene translation. *Trends Plant Sci* 19(2):63–66. doi:10.1016/j.tplants.2013.12.004
59. Charrin S, Le Naour F, Silvie O, Milhiet P-E, Boucheix C, Rubinstein E (2009) Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* 420(2):133–154. doi:10.1042/BJ20082422
60. Huang S, Yuan S, Dong M, Su J, Yu C, Shen Y, Xie X, Yu Y, Yu X, Chen S, Zhang S, Pontarotti P, Xu A (2005) The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* 86(6):674–684. doi:10.1016/j.ygeno.2005.08.004
61. Hemler ME (2008) Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 7(9):747–758. doi:10.1038/nrd2659
62. Boucheix C, Rubinstein E (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58(9):1189–1205. doi:10.1007/PL00000933
63. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E (2014) Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci* 127(Pt 17):3641–3648. doi:10.1242/jcs.154906
64. Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2003) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 28(2):106–112. doi:10.1016/S0968-0004(02)00014-2
65. Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H (2001) Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* 276(43):40055–40064. doi:10.1074/jbc.M105557200
66. Zöllner M (2009) Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* 9(1):40–55. doi:10.1038/nrc2543
67. Levy S, Shoham T (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5(2):136–148. doi:10.1038/nri1548
68. Hemler ME (2014) Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer* 14(1):49–60. doi:10.1038/nrc3640
69. Berditchevski F (2001) Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114(Pt 23):4143–4151
70. Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F (2009) Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol*:434–446. doi:10.1016/j.tcb.2009.06.004
71. Hemler ME (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:397–422. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609
72. Little KD, Hemler ME, Stipp CS (2004) Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell*:2375–2387. doi:10.1091/mbc.e03-12-0886
73. Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zöllner M (2007) A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant

- isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 5(6):553–567. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0384
74. Claas C, Stipp CS, Hemler ME (2001) Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem*:7974–7984. doi:10.1074/jbc.M008650200
  75. Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, Blacklow SC (2016) Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*:1041-1051.e11. doi:10.1016/j.cell.2016.09.056
  76. Hemler ME (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(10):801–811. doi:10.1038/nrm1736
  77. Karamatic Crew V, Burton N, Kagan A, Green CA, Levene C, Flinter F, Brady RL, Daniels G, Anstee DJ (2004) CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* 104(8):2217–2223. doi:10.1182/blood-2004-04-1512
  78. Wright MD, Geary SM, Fitter S, Moseley GW, Lau L-M, Sheng K-C, Apostolopoulos V, Stanley EG, Jackson DE, Ashman LK (2004) Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Mol Cell Biol* 24(13):5978–5988. doi:10.1128/MCB.24.13.5978-5988.2004
  79. Schröder J, Lüllmann-Rauch R, Himmerkus N, Pleines I, Nieswandt B, Orinska Z, Koch-Nolte F, Schröder B, Bleich M, Saftig P (2009) Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol Cell Biol*:1083–1094. doi:10.1128/MCB.01163-08
  80. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287(5451):319–321. doi:10.1126/science.287.5451.319
  81. Monk PN, Partridge LJ (2012) Tetraspanins: gateways for infection. *Infect Disord Drug Targets* 12(1):4–17. doi:10.2174/187152612798994957
  82. Pan S-J, Wu Y-B, Cai S, Pan Y-X, Liu W, Bian L-G, Sun B, Sun Q-F (2015) Over-expression of tetraspanin 8 in malignant glioma regulates tumor cell progression. *Biochem Biophys Res Commun*:476–482. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.128
  83. Wei L, Li Y, Suo Z (2015) TSPAN8 promotes gastric cancer growth and metastasis via ERK MAPK pathway. *Int J Clin Exp Med*:8599–8607
  84. Greco C, Bralet M-P, Ailane N, Dubart-Kupperschmitt A, Rubinstein E, Le Naour F, Boucheix C (2010) E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. *Cancer Res*:7674–7683. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4482
  85. Bhansali M, Zhou J, Shemshedini L (2015) TM4SF3 and AR: A Nuclear Complex that Stabilizes Both Proteins. *Mol Endocrinol* 30(1):13–25. doi:10.1210/me.2015-1075
  86. Scholz C-J, Jacob CP, Buttenschon HN, Kittel-Schneider S, Boreatti-Hümmer A, Zimmer M, Walter U, Lesch K-P, Mors O, Kneitz S, Deckert J, Reif A (2010) Functional variants of TSPAN8 are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(4):967–972. doi:10.1002/ajmg.b.31057
  87. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS (2016) Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(9):564–580. doi:10.1038/nrm.2016.80
  88. Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen Y-H (2013) Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers* 1(3):e24978. doi:10.4161/tisb.24978
  89. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(3):588–600. doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.017

90. González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(3):729–756. doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.018
91. Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M (2011) Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal* 15(5):1179–1193. doi:10.1089/ars.2011.3893
92. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters* 585(4):606–612. doi:10.1016/j.febslet.2011.01.028
93. Lal-Nag M, Morin PJ (2009) The claudins. *Genome Biol* 10(8):235. doi:10.1186/gb-2009-10-8-235
94. Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, Beavis RC, Lane L, Duek P, McQuade L, Kelleher NL, Baker MS (2016) Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J Proteome Res* 15(2):339–359. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00769
95. Günzel D, Yu ASL (2013) Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93(2):525–569. doi:10.1152/physrev.00019.2012
96. van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68:403–429. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404
97. Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141(7):1539–1550. doi:10.1083/jcb.141.7.1539
98. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147(6):1351–1363. doi:10.1083/jcb.147.6.1351
99. Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149(1):13–16. doi:10.1083/jcb.149.1.13
100. Suzuki H, Tani K, Fujiyoshi Y (2017) Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1397(1):25–34. doi:10.1111/nyas.13371
101. Angelow S, Ahlstrom R, Yu ASL (2008) Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(4):F867-76. doi:10.1152/ajprenal.90264.2008
102. Koval M (2013) Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers* 1(3):e24518. doi:10.4161/tisb.24518
103. Li WY, Huey CL, Yu ASL (2004) Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(6):F1063-71. doi:10.1152/ajprenal.00384.2003
104. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG (2003) Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(5):L1166-78. doi:10.1152/ajplung.00182.2003
105. Xing T, Benderman LJ, Sabu S, Parker J, Yang J, Lu Q, Ding L, Chen Y-H (2020) Tight Junction Protein Claudin-7 Is Essential for Intestinal Epithelial Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 9(4):641–659. doi:10.1016/j.jcmgh.2019.12.005
106. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y (2007) Claudin-7 expressed on lateral membrane of rat epididymal epithelium does not form aberrant tight junction strands. *Anat Rec (Hoboken)* 290(11):1431–1438. doi:10.1002/ar.20597
107. Ladwein M, Pape U-F, Schmidt D-S, Schnölzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zöller M (2005) The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 309(2):345–357. doi:10.1016/j.yexcr.2005.06.013

108. Heiler S, Mu W, Zöller M, Thuma F (2015) The importance of claudin-7 palmitoylation on membrane subdomain localization and metastasis-promoting activities. *Cell Commun Signal* 13:29. doi:10.1186/s12964-015-0105-y
109. Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA (2006) Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem* 281(47):36117–36123. doi:10.1074/jbc.M608853200
110. Alexandre MD, Jeansonne BG, Renegar RH, Tatum R, Chen Y-H (2007) The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl<sup>-</sup> permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 357(1):87–91. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.078
111. Alexandre MD, Lu Q, Chen Y-H (2005) Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 118(Pt 12):2683–2693. doi:10.1242/jcs.02406
112. Ouban A, Ahmed AA (2010) Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol* 25(1):83–90. doi:10.14670/HH-25.83
113. Tsujiwaki M, Murata M, Takasawa A, Hiratsuka Y, Fukuda R, Sugimoto K, Ono Y, Nojima M, Tanaka S, Hirata K, Kojima T, Sawada N (2015) Aberrant expression of claudin-4 and -7 in hepatocytes in the cirrhotic human liver. *Med Mol Morphol* 48(1):33–43. doi:10.1007/s00795-014-0074-z
114. Ono Y, Hiratsuka Y, Murata M, Takasawa A, Fukuda R, Nojima M, Tanaka S, Osanai M, Hirata K, Sawada N (2016) Claudins-4 and -7 might be valuable markers to distinguish hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma. *Virchows Arch* 469(4):417–426. doi:10.1007/s00428-016-1984-z
115. Dahiya N, Becker KG, Wood WH, Zhang Y, Morin PJ (2011) Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. *PLoS ONE* 6(7):e22119. doi:10.1371/journal.pone.0022119
116. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi O-P, Sukumar S (2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22(13):2021–2033. doi:10.1038/sj.onc.1206199
117. Lu Z, Ding L, Hong H, Hoggard J, Lu Q, Chen Y-H (2011) Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 317(13):1935–1946. doi:10.1016/j.yexcr.2011.05.019
118. (2020) Addgene: pET His6 TEV LIC cloning vector (2B-T). <http://www.addgene.org/29666/>. Zugegriffen: 08. September 2020
119. Claudin 7 (CLDN7) (NM\_001307) Human Tagged ORF Clone – RC200530 | OriGene. <https://cdn.origene.com/datasheet/rc200530.pdf>. Zugegriffen: 01. August 2020
120. TM4SF3 (TSPAN8) (NM\_004616) Human Tagged ORF Clone – RC202694 | OriGene. <https://cdn.origene.com/datasheet/rc202694.pdf>. Zugegriffen: 01. August 2020
121. Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7):2172–2175. doi:10.1073/pnas.86.7.2172
122. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258:598–599
123. Schmidt TGM, Skerra A (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2(6):1528–1535. doi:10.1038/nprot.2007.209

124. Carl U Expression and purification of proteins using Strep-tag(R) or Twin-Strep-tag(R). <https://www.iba-lifesciences.com/isotope/2/2-3206-100-Manual-Twin--Strep-tag.pdf>. Zugegriffen: 30. Juli 2020
125. Walker JM (Hrsg) The Proteomics Protocols Handbook. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Humana Press Inc., Totowa, NJ
126. Smith PK, Krohm RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* (150):76–85
127. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685. doi:10.1038/227680a0
128. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
129. Francis W. Lau and James U. Bowie A Method for Assessing the Stability of a Membrane Protein. *Biochemistry* 1997(36):5884–5892
130. Otzen DE (2003) Folding of DsbB in Mixed Micelles: A Kinetic Analysis of the Stability of a Bacterial Membrane Protein. *J Mol Biol* 330(4):641–649. doi:10.1016/S0022-2836(03)00624-7
131. Cymer F, Schneider D (2010) A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry* 49(2):279–286. doi:10.1021/bi901660t
132. Finger C, Volkmer T, Prodöhl A, Otzen DE, Engelman DM, Schneider D (2006) The stability of transmembrane helix interactions measured in a biological membrane. *J Mol Biol* 358(5):1221–1228. doi:10.1016/j.jmb.2006.02.065
133. Tome L, Steindorf D, Schneider D (2013) Genetic Systems for Monitoring Interactions of Transmembrane Domains in Bacterial Membranes. In: Senes A, Ghirlanda G (Hrsg) Membrane Proteins. Folding, Association, and Design, Bd 1063. Humana Press, Totowa, NJ, S 57–91
134. M. Schnarr, P. Oertel-Buchheit, M. Kazmaier, M. Granger-Schnarr DNA binding properties of the LexA repressor
135. J. H. Miller (Hrsg) (1972) Experiments in Molecular Genetics. Assay of  $\beta$ -Galactosidase. Cold Spring Harbor Laboratory
136. Geertsma ER, Nik Mahmood NAB, Schuurman-Wolters GK, Poolman B (2008) Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nat Protoc* 3(2):256–266. doi:10.1038/nprot.2007.519
137. Knol J, Sjollem K, Poolman B (1998) Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry* 37(46):16410–16415. doi:10.1021/bi981596u
138. Pernstich C, Senior L, MacInnes KA, Forsaith M, Curnow P (2014) Expression, purification and reconstitution of the 4-hydroxybenzoate transporter PcaK from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Protein Expression and Purification* 101(100):68–75. doi:10.1016/j.pep.2014.05.011
139. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47(W1):W636-W641. doi:10.1093/nar/gkz268
140. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
141. Jack Kyte, Russel F. Doolittle (1982) A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J Mol Biol* (157):105–132

- 
142. J. Glasgow et al. (Hrsg) (1998) Proc. Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Amer Assn for Artificial Intelligence
  143. Krogh A, Larsson B, Heijne G von, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3):567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
  144. Rost B, Fariselli P, Casadio R (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Science* (5):1704–1718
  145. Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7(8):1511–1522. doi:10.1038/nprot.2012.085
  146. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
  147. Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy, 3. Aufl. Springer, New York
  148. Lami H, Glasser N (1986) Indole's solvatochromism revisited. *The Journal of Chemical Physics* 84(2):597–604. doi:10.1063/1.450606
  149. Kim JE, Arjara G, Richards JH, Gray HB, Winkler JR (2006) Probing folded and unfolded states of outer membrane protein a with steady-state and time-resolved tryptophan fluorescence. *J Phys Chem B* 110(35):17656–17662. doi:10.1021/jp061991r
  150. Paslawski W, Lillelund OK, Kristensen JV, Schafer NP, Baker RP, Urban S, Otzen DE (2015) Cooperative folding of a polytopic  $\alpha$ -helical membrane protein involves a compact N-terminal nucleus and nonnative loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(26):7978–7983. doi:10.1073/pnas.1424751112
  151. Huysmans GHM, Baldwin SA, Brockwell DJ, Radford SE (2010) The transition state for folding of an outer membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9):4099–4104. doi:10.1073/pnas.0911904107
  152. Jerson L. Silva/Edith W. Miles/Gregorio Weber Pressure dissociation and conformational drift of the .beta. dimer of tryptophan synthase
  153. Moussa R (2012) Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik. Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2012. Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Gesundheit, Bd 54. Forschungszentrum Jülich, Jülich
  154. Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437(1-2):55–75. doi:10.1002/andp.19484370105
  155. Belardi B, Son S, Vahey MD, Wang J, Hou J, Fletcher DA (2018) Claudin-4 reconstituted in unilamellar vesicles is sufficient to form tight interfaces that partition membrane proteins. *J Cell Sci* 132(4). doi:10.1242/jcs.221556
  156. (2020) Fluorescence SpectraViewer | Thermo Fisher Scientific - DE. [https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?gclid=EAlaIqobChMI6pjapdaB6wIVCKp3Ch2WuwjVEAAYASAAEgLpvPD\\_BwE&ef\\_id=EAlaIqobChMI6pjapdaB6wIVCKp3Ch2WuwjVEAAYASAAEgLpvPD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL1365213!231922595944!e!!g!!spectra%20viewer&cid=bid\\_pca\\_aup\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_con#!/](https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?gclid=EAlaIqobChMI6pjapdaB6wIVCKp3Ch2WuwjVEAAYASAAEgLpvPD_BwE&ef_id=EAlaIqobChMI6pjapdaB6wIVCKp3Ch2WuwjVEAAYASAAEgLpvPD_BwE:G:s&s_kwid=AL1365213!231922595944!e!!g!!spectra%20viewer&cid=bid_pca_aup_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con#!/). Zugegriffen: 04. August 2020
  157. Greenfield NJ (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1(6):2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202
-

158. W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler (Hrsg) (1977) *Biophysik: Biophysik - Ein Lehrbuch*, 1. Aufl, Bd 25. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
159. Muller DJ (2008) AFM: a nanotool in membrane biology. *Biochemistry* 47(31):7986–7998. doi:10.1021/bi800753x
160. Allison DP, Mortensen NP, Sullivan CJ, Doktycz MJ (2010) Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2(6):618–634. doi:10.1002/wnan.104
161. Bruker (2021) PeakForce Tapping. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/afm-modes/peakforce-tapping.html>
162. Yeow N, Tabor RF, Garnier G (2017) Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Adv Colloid Interface Sci* 249:149–162. doi:10.1016/j.cis.2017.05.011
163. Nečas D, Klapetek P (2012) Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics* 10(1). doi:10.2478/s11534-011-0096-2
164. Katzen F, Chang G, Kudlicki W (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* 23(3):150–156. doi:10.1016/j.tibtech.2005.01.003
165. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC (2012) Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv* 30(5):1185–1194. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.016
166. Swartz J (2006) Developing cell-free biology for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33(7):476–485. doi:10.1007/s10295-006-0127-y
167. Behrendorff JBYH, Sandoval-Ibañez OA, Sharma A, Pribil M (2019) Membrane-Bound Protein Scaffolding in Diverse Hosts Using Thylakoid Protein CURT1A. *ACS Synth Biol* 8(4):611–620. doi:10.1021/acssynbio.8b00418
168. Dilworth MV, Piel MS, Bettaney KE, Ma P, Luo J, Sharples D, Poyner DR, Gross SR, Moncoq K, Henderson PJF, Miroux B, Bill RM (2018) Microbial expression systems for membrane proteins. *Methods* 147:3–39. doi:10.1016/j.ymeth.2018.04.009
169. Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
170. Jarsch IK, Daste F, Gallop JL (2016) Membrane curvature in cell biology: An integration of molecular mechanisms. *J Cell Biol* 214(4):375–387. doi:10.1083/jcb.201604003
171. Prévost C, Sharp ME, Kory N, Lin Q, Voth GA, Farese RV, Walther TC (2018) Mechanism and Determinants of Amphipathic Helix-Containing Protein Targeting to Lipid Droplets. *Dev Cell* 44(1):73–86.e4. doi:10.1016/j.devcel.2017.12.011
172. Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert E (2002) Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem* 277(40):36991–37000. doi:10.1074/jbc.M205265200
173. Delandre C, Penabaz TR, Passarelli AL, Chapes SK, Clem RJ (2009) Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Exp Cell Res* 315(11):1953–1963. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.013
174. King C, Stoneman M, Raicu V, Hristova K (2016) Fully quantified spectral imaging reveals in vivo membrane protein interactions. *Integr Biol (Camb)* 8(2):216–229. doi:10.1039/c5ib00202h
175. Tarry M, Skaar K, Heijne G von, Draheim RR, Högbom M (2012) Production of human tetraspanin proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 82(2):373–379. doi:10.1016/j.pep.2012.02.003
176. Skaar K, Korza HJ, Tarry M, Sekyrova P, Högbom M (2015) Expression and Subcellular Distribution of GFP-Tagged Human Tetraspanin Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 10(7):e0134041. doi:10.1371/journal.pone.0134041

177. Jamshad M, Rajesh S, Stamataki Z, McKeating JA, Dafforn T, Overduin M, Bill RM (2008) Structural characterization of recombinant human CD81 produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 57(2):206–216. doi:10.1016/j.pep.2007.10.013
178. Takayama H, Chelikani P, Reeves PJ, Zhang S, Khorana HG (2008) High-level expression, single-step immunoaffinity purification and characterization of human tetraspanin membrane protein CD81. *PLoS ONE* 3(6):e2314. doi:10.1371/journal.pone.0002314
179. Joseph BC, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S (2015) An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *J Cell Sci Ther* 06(05). doi:10.4172/2157-7013.1000221
180. Privé GG (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41(4):388–397. doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.007
181. Slouka C, Kopp J, Spadiut O, Herwig C (2019) Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Appl Microbiol Biotechnol* 103(3):1143–1153. doi:10.1007/s00253-018-9569-1
182. Fleschner CR, Cenedella RJ (1993) Isolation of a non-sedimenting membrane fraction from the water soluble fraction of bovine lens. *Exp Eye Res* 56(6):649–657. doi:10.1006/exer.1993.1082
183. Charrin S, Manié S, Oualid M, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E (2002) Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Letters* 516(1-3):139–144. doi:10.1016/S0014-5793(02)02522-X
184. Yang X, Claas C, Kraeft S-K, Chen LB, Wang Z, Kreidberg JA, Hemler ME (2002) Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* 13(3):767–781. doi:10.1091/mbc.01-05-0275
185. Zhu Y-Z, Luo Y, Cao M-M, Liu Y, Liu X-Q, Wang W, Wu D-G, Guan M, Xu Q-Q, Ren H, Zhao P, Qi Z-T (2012) Significance of palmitoylation of CD81 on its association with tetraspanin-enriched microdomains and mediating hepatitis C virus cell entry. *Virology* 429(2):112–123. doi:10.1016/j.virol.2012.03.002
186. Termini CM, Gillette JM (2017) Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front Cell Dev Biol* 5:34. doi:10.3389/fcell.2017.00034
187. Zhao J, Krystofiak ES, Ballesteros A, Cui R, van Itallie CM, Anderson JM, Fenollar-Ferrer C, Kachar B (2018) Multiple claudin-claudin cis interfaces are required for tight junction strand formation and inherent flexibility. *Commun Biol* 1:50. doi:10.1038/s42003-018-0051-5
188. Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular Cloning. Laboratory Manual, Fourth Edition, 4. Aufl.* Cold Spring Harbor Laboratory Press
189. Mortimer CE, Müller U (2010) *Chemie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart
190. Barry H, Honig, Wayne L, Hubbell, Ross F. Flewelling *ELECTROSTATIC INTERACTIONS IN MEMBRANES AND PROTEINS*
191. Zhou H-X, Pang X (2018) Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chem Rev* 118(4):1691–1741. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00305
192. Jean-Louis Rigaud, Bruno Pitard, Daniel Levey (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* (1231):223–246
193. Attwood S, Choi Y, Leonenko Z (2013) Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *IJMS* 14(2):3514–3539. doi:10.3390/ijms14023514
194. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB (2001) Mutations in the

- Gene Encoding Tight Junction Claudin-14 Cause Autosomal Recessive Deafness DFNB29. *Cell* 104(1):165–172. doi:10.1016/S0092-8674(01)00200-8
195. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science* 285(5424):103–106. doi:10.1126/science.285.5424.103
196. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(24):E3095-103. doi:10.1073/pnas.1500851112
197. Schneider D, Engelman DM (2003) GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem* 278(5):3105–3111. doi:10.1074/jbc.M206287200
198. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(36):15350–15355. doi:10.1073/pnas.0907724106
199. Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S (2010) Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(42):18010–18015. doi:10.1073/pnas.1009399107
200. Briand L, Marcion G, Kriznik A, Heydel JM, Artur Y, Garrido C, Seigneuric R, Neiers F (2016) A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 6:33037. doi:10.1038/srep33037
201. Mitic LL, Unger VM, Anderson JM (2003) Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci* 12(2):218–227. doi:10.1110/ps.0233903
202. Shinoda T, Shinya N, Ito K, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Tomita T, Ishibashi Y, Hirabayashi Y, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yokoyama S (2016) Cell-free methods to produce structurally intact mammalian membrane proteins. *Sci Rep* 6:30442. doi:10.1038/srep30442
203. Dithmer S, Staat C, Müller C, Ku M-C, Pohlmann A, Niendorf T, Gehne N, Fallier-Becker P, Kittel Á, Walter FR, Veszelka S, Deli MA, Blasig R, Haseloff RF, Blasig IE, Winkler L (2017) Claudin peptidomimetics modulate tissue barriers for enhanced drug delivery. *Ann N Y Acad Sci* 1397(1):169–184. doi:10.1111/nyas.13359
204. Miles AJ, Wallace BA (2016) Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem Soc Rev* 45(18):4859–4872. doi:10.1039/c5cs00084j
205. Dokladny K, Zuhl MN, Moseley PL (2016) Intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins with heat and exercise. *J Appl Physiol* (1985) 120(6):692–701. doi:10.1152/jappphysiol.00536.2015
206. Dokladny K, Moseley PL, Ma TY (2006) Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(2):G204-12. doi:10.1152/ajpgi.00401.2005
207. Charalambous K, O'Reilly AO, Bullough PA, Wallace BA (2009) Thermal and chemical unfolding and refolding of a eukaryotic sodium channel. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788(6):1279–1286. doi:10.1016/j.bbamem.2009.02.005

- 
208. Miles AJ, Wallace BA, Esmann M (2011) Correlation of structural and functional thermal stability of the integral membrane protein Na,K-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(10):2573–2580. doi:10.1016/j.bbamem.2011.06.009
209. Veerappan A, Cymer F, Klein N, Schneider D (2011) The tetrameric  $\alpha$ -helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry* 50(47):10223–10230. doi:10.1021/bi201266m
210. Ulmschneider MB, Doux JPF, Killian JA, Smith JC, Ulmschneider JP (2010) Mechanism and kinetics of peptide partitioning into membranes from all-atom simulations of thermostable peptides. *J Am Chem Soc* 132(10):3452–3460. doi:10.1021/ja909347x
211. Nakamura S, Fujiyoshi Y, Irie K (2018) Enhancement of the thermostability of mouse claudin-3 on complex formation with the carboxyl-terminal region of *Clostridium perfringens* enterotoxin improves crystal quality. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 74(Pt 3):150–155. doi:10.1107/S2053230X18002005
212. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species Within and Between Tight Junction Strands. *J Cell Biol* 147(4):891–903
213. van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM (2011) Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J Biol Chem* 286(5):3442–3450. doi:10.1074/jbc.M110.195578
214. Findley MK, Koval M (2009) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* 61(4):431–437. doi:10.1002/iub.175.
215. Hempel C, Protze J, Altun E, Riebe B, Piontek A, Fromm A, Lee IM, Saleh T, Günzel D, Krause G, Piontek J (2020) Assembly of Tight Junction Strands: Claudin-10b and Claudin-3 Form Homo-Tetrameric Building Blocks that Polymerise in a Channel-Independent Manner. *J Mol Biol* 432(7):2405–2427. doi:10.1016/j.jmb.2020.02.034
216. James T. Vivian, Patrik R. Callis (2001) Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophys J (Volume 80)*:2093–2109
217. Trefz M (2019) Die SDS-induzierte Entfaltung des Aquaglyceroporins GlpF. Entfaltungsstudien und Untersuchungen zur Rolle der Tryptophane im GlpF-Tetramer. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität
218. Hong H, Tamm LK (2004) Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(12):4065–4070. doi:10.1073/pnas.0400358101
219. Raghuraman H, Chatterjee S, Das A (2019) Site-Directed Fluorescence Approaches for Dynamic Structural Biology of Membrane Peptides and Proteins. *Front Mol Biosci* 6:96. doi:10.3389/fmolb.2019.00096
220. Anjana R, Vaishnavi MK, Sherlin D, Kumar SP, Naveen K, Kanth PS, Sekar K (2012) Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. *Bioinformation* 8(24):1220–1224. doi:10.6026/97320630081220
221. Renthal R (2006) An unfolding story of helical transmembrane proteins. *Biochemistry* 45(49):14559–14566. doi:10.1021/bi0620454
222. Reynolds JA, Tanford C (1970) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem* 245(19):5161–5165
223. Wayne L. Mattice/James M. Riser/Donald S. Clark (1976) Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 15(19):4264–4272
224. Mbaye MN, Hou Q, Basu S, Teheux F, Pucci F, Rooman M (2019) A comprehensive computational study of amino acid interactions in membrane proteins. *Sci Rep* 9(1):12043. doi:10.1038/s41598-019-48541-2
-

- 
225. Marek PJ, Patsalo V, Green DF, Raleigh DP (2012) Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among Debye screening, ion selectivity, and Hofmeister effects. *Biochemistry* 51(43):8478–8490. doi:10.1021/bi300574r
226. Hancock SP, Hiller DA, Perona JJ, Jen-Jacobson L (2011) The energetic contribution of induced electrostatic asymmetry to DNA bending by a site-specific protein. *J Mol Biol* 406(2):285–312. doi:10.1016/j.jmb.2010.12.012
227. Balakrishnan K, M. Krishnan N, J. Rao B (2009) Salt Modulates Oligomerization Properties of hRad51 and hRad52 Proteins. *TOBIOJ* 2(1):1–9. doi:10.2174/1874196700902010001
228. Chambers JW, Kearns MT, Morris MT, Morris JC (2008) Assembly of heterohexameric trypanosome hexokinases reveals that hexokinase 2 is a regulable enzyme. *J Biol Chem* 283(22):14963–14970. doi:10.1074/jbc.M802124200
229. Wang L, Tonggu L (2015) Membrane protein reconstitution for functional and structural studies. *Sci. China Life Sci.* 58(1):66–74. doi:10.1007/s11427-014-4769-0
230. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666(1-2):105–117. doi:10.1016/j.bbamem.2004.04.011
231. Rigaud J-L, Pitard B, Levy D (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1231(3):223–246. doi:10.1016/0005-2728(95)00091-v
232. Garten M, Aimon S, Bassereau P, Toombes GES (2015) Reconstitution of a transmembrane protein, the voltage-gated ion channel, KvAP, into giant unilamellar vesicles for microscopy and patch clamp studies. *J Vis Exp* (95):52281. doi:10.3791/52281
233. Aimon S, Manzi J, Schmidt D, Poveda Larrosa JA, Bassereau P, Toombes GES (2011) Functional reconstitution of a voltage-gated potassium channel in giant unilamellar vesicles. *PLoS ONE* 6(10):e25529. doi:10.1371/journal.pone.0025529
234. Li Q, Jogini V, Wanderling S, Cortes DM, Perozo E (2012) Expression, purification, and reconstitution of the voltage-sensing domain from Ci-VSP. *Biochemistry* 51(41):8132–8142. doi:10.1021/bi300980q.
235. Dieudonné DJ, Gurnev PA, Rogozea AL, Ray BD, Petrache HI (2010) Physical Properties of the Lipid Diphytanoyl Phosphatidylcholine (DPhPc) used for Ion Channel Measurements. *Biophys J* 98(3):667a-668a. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.3666
236. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2):112–124. doi:10.1038/nrm2330
237. Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E, Krause G, Gast K, Kolbe M, Piontek J (2006) On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci* 63(4):505–514. doi:10.1007/s00018-005-5472-x
238. Cording J, Berg J, Käding N, Bellmann C, Tscheik C, Westphal JK, Milatz S, Günzel D, Wolburg H, Piontek J, Huber O, Blasig IE (2013) In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci* 126(Pt 2):554–564. doi:10.1242/jcs.114306
239. Whited AM, Park PS-H (2014) Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838(1 Pt A):56–68. doi:10.1016/j.bbamem.2013.04.011
240. Hussain MA, Agnihotri A, Siedlecki CA (2005) AFM imaging of ligand binding to platelet integrin alphaIIbbeta3 receptors reconstituted into planar lipid bilayers. *Langmuir* 21(15):6979–6986. doi:10.1021/la046943h
-

241. Fotiadis D (2012) Atomic force microscopy for the study of membrane proteins. *Curr Opin Biotechnol* 23(4):510–515. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.032
242. Lim TS, Vedula SRK, Hunziker W, Lim CT (2008) Kinetics of adhesion mediated by extracellular loops of claudin-2 as revealed by single-molecule force spectroscopy. *J Mol Biol* 381(3):681–691. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.009
243. Lim TS, Vedula SRK, Hui S, Kausalya PJ, Hunziker W, Lim CT (2008) Probing effects of pH change on dynamic response of Claudin-2 mediated adhesion using single molecule force spectroscopy. *Exp Cell Res* 314(14):2643–2651. doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.015
244. Turksen K (2011) Claudins, Bd 762. Humana Press, Totowa, NJ
245. Alberini G, Benfenati F, Maragliano L (2017) A refined model of claudin-15 tight junction paracellular architecture by molecular dynamics simulations. *PLoS ONE* 12(9):e0184190. doi:10.1371/journal.pone.0184190
246. Suzuki H, Tani K, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y (2015) Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol* 427(2):291–297. doi:10.1016/j.jmb.2014.10.020
247. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE (2008) Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 22(1):146–158. doi:10.1096/fj.07-8319com
248. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008) Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(3):631–645. doi:10.1016/j.bbamem.2007.10.018
249. Zanotti G, Folli C, Cendron L, Alfieri B, Nishida SK, Gliubich F, Pasquato N, Negro A, Berni R (2008) Structural and mutational analyses of protein-protein interactions between transthyretin and retinol-binding protein. *FEBS J* 275(23):5841–5854. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06705.x
250. Elazar A, Weinstein J, Biran I, Fridman Y, Bibi E, Fleishman SJ (2016) Mutational scanning reveals the determinants of protein insertion and association energetics in the plasma membrane. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.12125
251. Zhou NE, Kay CM, Hodges RS (1992) Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* 267(4):2664–2670
252. Suzuki H, Tani K, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y (2015) Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol* 427(2):291–297. doi:10.1016/j.jmb.2014.10.020
253. SnapGene (2020) SnapGene Viewer | Free software for plasmid mapping, primer design, and restriction site analysis. <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>. Zugegriffen: 21. August 2020

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Membranlipiden. ....	2
Abbildung 2: Lipidformen und Lipidaggregation.....	4
Abbildung 3: Periphere und integrale Membranproteine. ....	5
Abbildung 4: Das Drei-Stufen-Modell der Membranproteinfaltung. ....	6
Abbildung 5: Morphologie von <i>Synechocystis</i> Wildtyp (A) im Vergleich zu einer CurT-defiziten (curT <sup>-</sup> ) Variante (B).....	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Tetraspanin-Struktur.....	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Claudin-Struktur und Funktion.....	11
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Präzipitation von Claudin-7.....	49
Abbildung 9: Funktionsweise des GALLEX-Systems. ....	49
Abbildung 10: Reaktionskatalyse der $\beta$ -Galaktosidase. ....	50
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Claudin-7 Rekonstitution in DOPC-Liposomen. ....	52
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Prinzips eines diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten.....	53
Abbildung 13: Anregungs- und Emissionsspektren von LissRhod-PE und NBD-PE. ....	56
Abbildung 14: Schematische Darstellung des FRET-Assays zur Bestimmung der <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-7. ....	56
Abbildung 15: Charakteristische CD-Spektren für Sekundärstrukturelemente. ....	58
Abbildung 16: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops (engl.: <i>Atomic force microscope</i> , AFM), verändert nach [160]. ....	60
Abbildung 17: Aminosäurevergleich der ersten 30 Aminosäuren der Proteinsequenz des slr0483 Proteins aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, mit 50 homologen Proteinen aus Cyanobakterien.....	65
Abbildung 18: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von CurT. ....	67
Abbildung 19: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilisation von CurT mit verschiedenen Detergenzien. ....	69
Abbildung 20: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der CurT Reinigung mittels IMAC. ....	71
Abbildung 21: EM-Aufnahmen von CurT, DOPC/DOPG-Liposomen und Proteoliposomen. ....	72
Abbildung 22: Schematische Darstellung CurT. ....	73
Abbildung 23: Vorhersage der Transmembranhelices von CurT anhand der Aminosäuresequenz mittels TMHMM-Server [143]. ....	73
Abbildung 24: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Reinigungen der CurT-Fragmente nach wt-Protokoll. ....	76
Abbildung 25: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von Tetraspanin-8. ....	81
Abbildung 26: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilitätsfähigkeit verschiedener Detergenzien. ....	82
Abbildung 27: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Proteinbindung an die Ni-NTA Agarose. ....	84
Abbildung 28: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der Reinigung von Tetraspanin-8.....	86
Abbildung 29: Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Dimerisierung von Tetraspanin- 8 im GALLEX-Experiment. ....	87
Abbildung 30: Ausschnitt aus dem Aminosäurevergleich von Tetraspanin-8 mit CD151 und CD81. ....	89
Abbildung 31: Einfluss der Cystein-Mutationen auf die Dimerisierung von Tetraspanin-8.....	89
Abbildung 32: Schematische Darstellung des mCherry-Konstruktes von Tetraspanin-8. ....	91

Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von HEK293 transfiziert mit mCherry-Konstrukten von Tetraspanin-8 und fünf Cystein-Mutanten.....	92
Abbildung 34: Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment. ....	98
Abbildung 35: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von Claudin-7. ....	100
Abbildung 36: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Solubilisationsfähigkeit verschiedener Detergenzien. ....	101
Abbildung 37: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Claudin-7 Reinigung mittels IMAC. ....	103
Abbildung 38: SDS-PAGE-Analyse der Claudin-7 Reinigung über eine <i>Strep</i> -Tactin <sup>®</sup> -Säule. ....	104
Abbildung 39: CD-Spektrum von Claudin-7.....	105
Abbildung 40: Thermische Denaturierung von Claudin-7. ....	106
Abbildung 41: Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie von Claudin-7. ....	107
Abbildung 42: Strukturmodell von Claudin-7 mit Fokus auf die Tryptophan-Seitenketten. ....	108
Abbildung 43: Einfluss von SDS auf die Tryptophan-Fluoreszenz von Claudin-7, sowie auf die Oligomerbildung.....	109
Abbildung 44: Analyse der Entfaltung von Claudin-7 über die mittlere Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ . ....	111
Abbildung 45: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Claudin-7. ....	112
Abbildung 46: Stabilität von DOPC-Liposomen gegenüber steigender LDAO-Konzentration. ....	114
Abbildung 47: Analyse der rekonstituierten Liposomen mittels Fluoreszenzspektroskopie und Western Blot.....	115
Abbildung 48: Ergebnis des FRET-Assays zur Betrachtung der Kopf-zu-Kopf Interaktion von Claudin-7. ....	117
Abbildung 49: AFM-Aufnahmen von Claudin-7 Membranen und DOPC Membranen. ....	118
Abbildung 50: Profil-Analyse der AFM-Aufnahme von Claudin-7 Membranen. ....	119
Abbildung 51: Analyse des Durchmessers und der Feinstruktur der Claudin-7 Membranpunkte. ....	120
Abbildung 52: AFM-Aufnahmen der Claudin-7 Membranen ohne NaCl. ....	121
Abbildung 53: Betrachtung der Claudin-7 Oligomere mittels AFM. ....	122
Abbildung 54: Position der sechs Aminosäuren, die potentiell für eine Interaktion von Claudin-7 in der Membran verantwortlich sind. ....	123
Abbildung 55: Einfluss der Mutationen auf die Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment. ....	124
Abbildung 56: SDS-PAGE-Analyse der über IMAC gereinigten Mutanten von Claudin-7. ....	125
Abbildung 57: CD-Spektren von Claudin-7 und den Mutanten.....	127
Abbildung 58: Thermische Denaturierung von Claudin-7*.....	128
Abbildung 59: Betrachtung der Entfaltung von Claudin-7 und Claudin-7* über die Differenz der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle - \langle\lambda\rangle_{\text{Start}}$ . ....	129
Abbildung 60: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Claudin-7, bzw. der Mutationen im Interaktionsbereich. ....	130
Abbildung 61: Ergebnis des FRET-Assays zur Betrachtung der Kopf-zu-Kopf-Interaktionen von Claudin-7*.....	131
Abbildung 62: Profil-Analyse der AFM Aufnahme von Claudin-7* Membranen mit und ohne NaCl. ....	133
Abbildung 63: Schematische Darstellung eines Claudin-Proteins.....	134
Abbildung 64: Mögliche Interaktionspartner der Tryptophan-Seitenketten von Claudin-7 im Übergangsbereich zu den Lipidkopfgruppen der Membran. ....	141

Abbildung 65: Elektrostatische Interaktionsfläche zwischen Claudin-15-Proteinen im mClaudin-15 Kristall (bearbeitet nach [29]).	143
Abbildung 66: Model der Spreitung von Claudin-7 Proteoliposomen auf einer Mica-Oberfläche.	146
Abbildung 67: Vektorkarte von pET303CTHis_slr0483.	176
Abbildung 68: Vektorkarte von pET303CTHis_slr0483TM.	177
Abbildung 69: Vektorkarte von pET303CTHis_slr0483N.	177
Abbildung 70: Vektorkarte von pET303CTHis_slr0483C.	178
Abbildung 71: Vektorkarte von pET303CTHis_TSPAN8.	178
Abbildung 72: Vektorkarte von pLexA_TSPAN8.	179
Abbildung 73: Vektorkarte von pcDNA3.1_TSPAN8_mCherry.	179
Abbildung 74: Vektorkarte von pLexA_Cldn7.	180
Abbildung 75: Vektorkarte von pcDNA3.1_Cldn7_mCherry.	180
Abbildung 76: Vektorkarte von pET_His6_StrepII_Cldn7.	181
Abbildung 77: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression von CurT.	182
Abbildung 78: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression des TM-Fragmentes von CurT.	183
Abbildung 79: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression des N-term-Fragmentes von CurT.	184
Abbildung 80: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression des C-term-Fragmentes von CurT.	185
Abbildung 81: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression des C-term-Fragmentes von CurT in Tuner(DE3)pLysS.	186
Abbildung 82: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von L-cells und HeLa transfiziert mit mCherry-Konstrukten von Claudin-7.	186
Abbildung 83: Western Blot-Analyse der Membranpreparation von HEK293 transfiziert mit Claudin-7-FLAG.	187
Abbildung 84: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression von Claudin-7.	187
Abbildung 85: Chromatogramme der Kalibrierung von Superose 12 10/300 GL-Säule (GE Healthcare).	188
Abbildung 86: Zeitaufgelöste Messung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ von Claudin-7 bei $\chi(\text{SDS}) = 0,36$ .	189
Abbildung 87: Dünnschichtchromatographie (DC) der Proteoliposomen-Ansätze.	189
Abbildung 88: Einfluss von krankheitsrelevanten Mutationen auf die Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment.	190
Abbildung 89: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie der Claudin-7 Mutanten V70A (A), R81A (B) und F148A (C).	191
Abbildung 90: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie der Claudin-7 Mutanten Y149A (A), E160A (B) und F161A (C).	193
Abbildung 91: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie der Claudin-7 Mutanten Claudin-7* (A), Claudin-7' (B) und R81A_Y149A (C).	195
Abbildung 92: SDS-PAGE-Analyse des Einflusses von SDS auf die Oligomerbildung von Claudin-7*.	196
Abbildung 93: Betrachtung der Entfaltung von Claudin-7, Claudin-7*, Claudin-7' und Claudin-7_R81A_Y149A über die Differenz der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle - \langle \lambda \rangle_{\text{Start}}$ .	196
Abbildung 94: SDS-PAGE-Analyse des Einflusses von SDS auf die Oligomerbildung von Claudin-7_R81A_Y149A (A) und Claudin-7' (B).	197

Abbildung 95: Betrachtung der Entfaltung von Claudin-7, Claudin-7*, Claudin-7_V70A (A), Claudin-7_R81A (B), Claudin-7_F148A (C), Claudin-7_Y149A (D), Claudin-7_E160A (E) und Claudin-7_F161A (F) über die Differenz der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle - \langle \lambda \rangle_{\text{Start}}$ .....	198
Abbildung 96: SDS-PAGE-Analyse des Einflusses von SDS auf die Oligomerbildung von Claudin-7_V70A (A), Claudin-7_R81A (B), Claudin-7_F148A (C), Claudin-7_Y149A (D), Claudin-7_E160A (E) und Claudin-7_F161A (F). .....	200
Abbildung 97: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Claudin-7, sowie den Interaktionsmutanten.....	203

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien. ....	15
Tabelle 2: Verwendete Bakterienmedien. ....	18
Tabelle 3: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze. ....	18
Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und deren Zusätze. ....	18
Tabelle 5: Verwendete Antikörper. ....	19
Tabelle 6: Verwendete Größenstandards. ....	19
Tabelle 7: Verwendete Kitsysteme.....	19
Tabelle 8: Verwendete <i>E. coli</i> -Bakterienstämme. ....	20
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.....	20
Tabelle 10: verwendete Enzyme und deren Puffer.....	21
Tabelle 11: Verwendete Plasmidvektoren. ....	21
Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide.....	23
Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	26
Tabelle 14: Verwendete Geräte. ....	26
Tabelle 15: Verwendete Programme .....	28
Tabelle 16: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit 50 $\mu\text{L}$ Gesamtvolumen. ....	29
Tabelle 17: Verwendetes PCR-Programm. ....	29
Tabelle 18: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur ortsspezifischen Mutagenese mit 50 $\mu\text{L}$ Gesamtvolumen. Der Zusatz von $\text{MgCl}_2$ und DMSO kann je nach Bedarf angepasst werden. ....	30
Tabelle 19: Verwendetes PCR-Programm zur ortsspezifischen Mutagenese. ....	30
Tabelle 20: $\text{OD}_{600}$ für die Inokulation der Hauptkultur.....	35
Tabelle 21: Expressionsvektor, <i>E. coli</i> Expressionsstamm und Expressionsbedingungen der verschiedenen Proteine ( $\text{ÜN} \triangleq$ über Nacht). ....	36
Tabelle 22: Extinktionskoeffizienten und Proteingröße der in dieser Arbeit isolierten Proteine. ....	43
Tabelle 23: Zusammensetzung der SDS-Acrylamidgelle. ....	44
Tabelle 24: Molenbrüche und zugehörige SDS-Konzentrationen der verwendeten Titrationsansätze. ....	48
Tabelle 25: Verwendete Programme zur Strukturvorhersage von Proteinen. ....	54
Tabelle 26: Verwendete Parameter zur Ermittlung des FRET-Signals.....	56
Tabelle 27: Messparameter für einzelne CD-Spektren. ....	59
Tabelle 28: Messparameter für die thermische Denaturierung. ....	59
Tabelle 29: Messparameter der AFM-Messungen.....	62

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
$\langle \lambda \rangle$	Mittlere Wellenlänge
$\lambda$	Wellenlänge
$\chi$	Stoffmengenanteil, Molenbruch
°C	Grad Celsius
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
Å	Angström
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: <i>Atomic force microscopy</i> )
Ala, A	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxodisulfat
Arg, R	Arginin
$A_x$	Absorption bei Wellenlänge x
BCA	Bicinchoinsäure (engl.: <i>Bicinchoninic acid</i> )
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C-	Carboxyl-
Ca.	circa
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
CD	Zirkulardichroismus (engl.: <i>circular dichroism</i> )
ceQOHR	<i>Chloroplast Envelope Quinone Oxidoreduktase Homologue</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CMC	Kritische Mizellenkonzentration (engl.: <i>critical micellar concentration</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSP	Circumsporozoite protein
Cys, C	Cystein
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie

---

DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DGDG	Digalactosyldiacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DOPG	Dioleoylphosphatidylglycerin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure (engl.: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EM	Elektronen Mikroskopie
Engl.	Englisch
FCS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
FSI-FRET	<i>Fully Quantified Spectral Imaging-FRET</i>
fw	Vorwärts (engl.: <i>forward</i> )
g	Gramm
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
GpA	Glycophorin A
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HABA	2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
His, H	Histidin
His-tag	Polyhistidinschwanz
I	Intensität
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> -Medium

---

LDAO	Lauryldimethylamin-N-oxid
Leu, L	Leucin
LissRhod-PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(Lissaminerhodamin B sulfonyl) (Ammonium Salz)
Lys, K	Lysin
M	Molar
MBP	Maltose bindendes Protein
Met, M	Methionin
mg	Milligramm
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerin
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
n	Anzahl der Proben
N-	Amino-
NaOH	Natriumhydroxid
NBD-PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (Ammonium Salz)
nm	Nanometer
NTA	Nitriloessigsäure
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge x
OG	Octyl-β-glucosid
OmpA	<i>Outer membrane protein A</i>
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>Polymerase chain reaction</i> )
PDB-ID	Proteindatenbank-Identifikationsnummer (engl.: <i>protein data bank identifier</i> )
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PG	Phosphatidylglycerin
Phe, F	Phenylalanin

PI	Phosphatidylinositol
Pro, P	Prolin
PS	Phosphatidylserin
PSI	Einheit für Druck (engl.: <i>pounds per inch</i> , 1 PSI = 0,07 bar)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
re	Rückwärts (engl.: <i>reverse</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minutes</i> )
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl.: <i>Standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>Sodium dodecyl sulfat</i> )
Ser, S	Serin
SM	Sphingomyelin
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerin
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure (engl.: <i>Trichloroacetic acid</i> )
TEM	Tetraspanin angereicherte Mikrodomänen (engl.: <i>Tetraspanin enriched microdomains</i> )
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp, W	Tryptophan
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
Tyr, Y	Tyrosin
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Val, V	Valin
VE	Vollentsalzt
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (engl.: <i>yellow fluorescent protein</i> )
z.B.	zum Beispiel

## 6.4 Weitere Themen, betreute Abschlussarbeiten und Forschungsmodul

### *tRNA Import Protein (tRip)*

Das Protein tRip (tRNA Import Protein) ist in *Plasmodium falciparum* vermutlich für den Import von tRNA verantwortlich. *In vivo* Untersuchungen klassifizierten das Protein als Membranprotein. Die während dieser Promotion durchgeführten *in vitro* Untersuchungen konnten keine Membranständigkeit von rekombinanten tRip nachweisen.

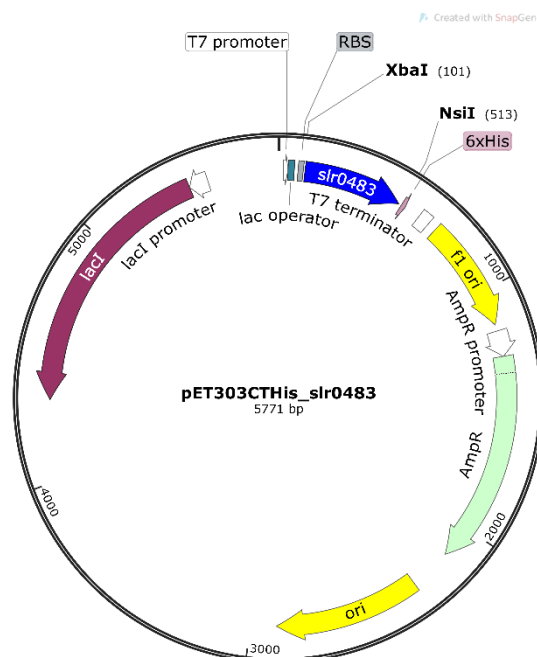
Limmer, L. (2017). *Untersuchung zur Funktion der C-terminalen  $\alpha$ -Helix des bakteriellen ABC-Transporters BmrA*. Bachelorarbeit.

Limmer, L. (2017). *Cyanophycin und dessen Derivate*. Forschungsmodul.

Mater, V. (2018). *Expression und Reinigung des Birkenpollenallergens Bet v 1*. Bachelorarbeit.

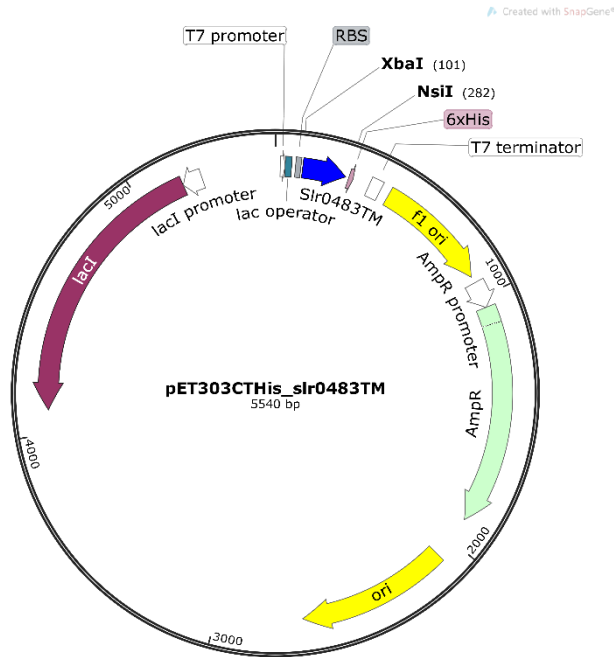
Kaltbeizel, J. (2018). *Synthese und Charakterisierung von Cyanophycin-Derivaten*. Masterarbeit.

## 6.5 Vektorkarten



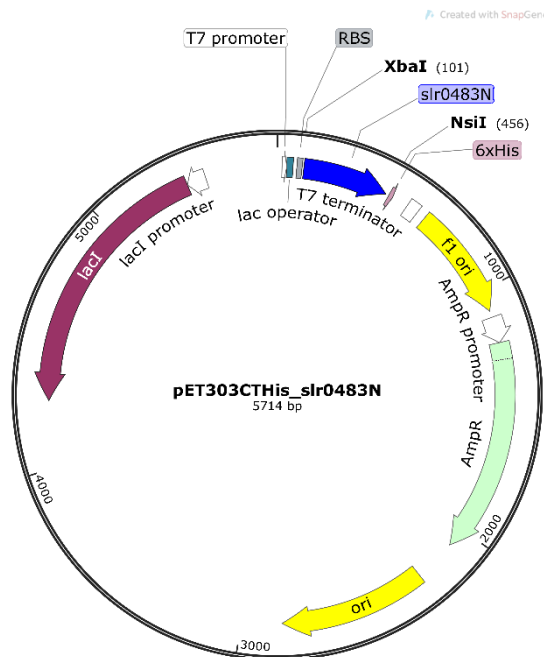
**Abbildung 67: Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für den Genlocus slr0483 codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. Slr0483 wurde über die Endonucleasen XbaI und NsiI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



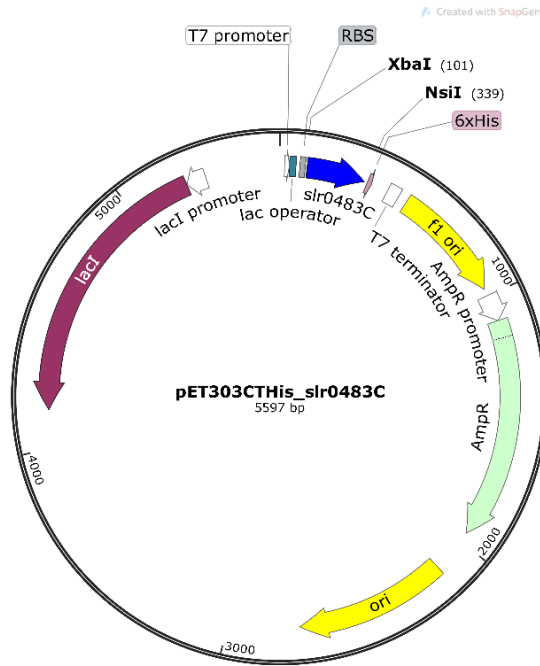
**Abbildung 68: Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483TM.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483TM. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für den Genlokus slr0483TM codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. Slr0483TM wurde über die Endonucleasen XbaI und NsiI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



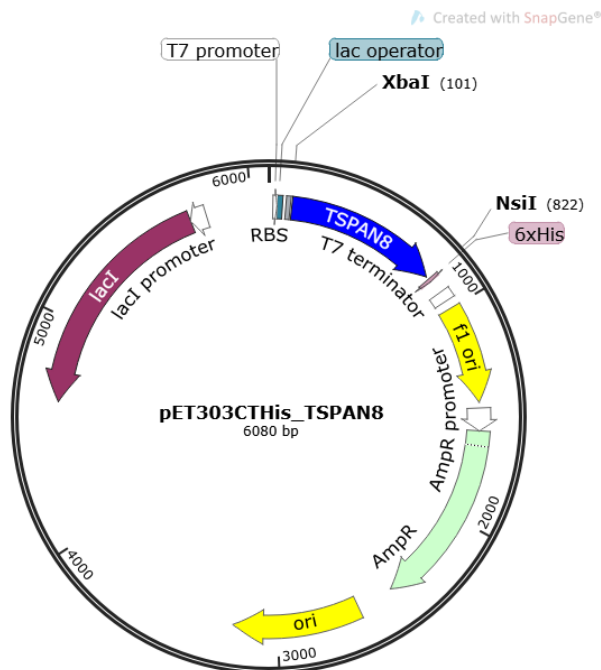
**Abbildung 69: Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483N.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483N. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für den Genlokus slr0483N codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. Slr0483N wurde über die Endonucleasen XbaI und NsiI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



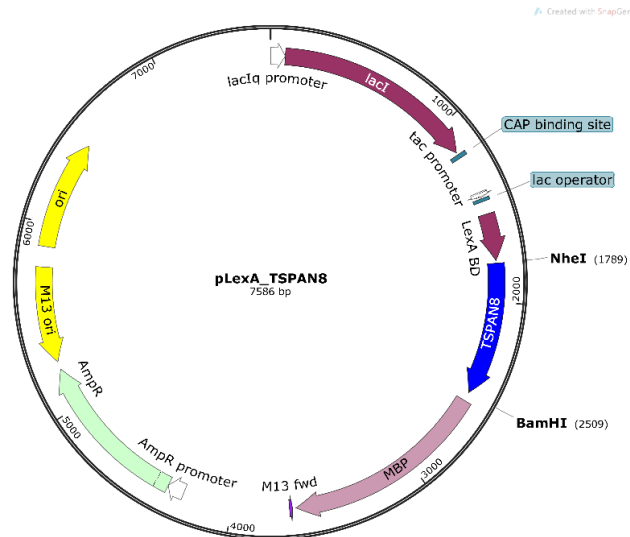
**Abbildung 70: Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483C.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pET303CTHis\_slr0483C. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für den Genlokus slr0483C codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. Slr0483C wurde über die Endonucleasen XbaI und NsiI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



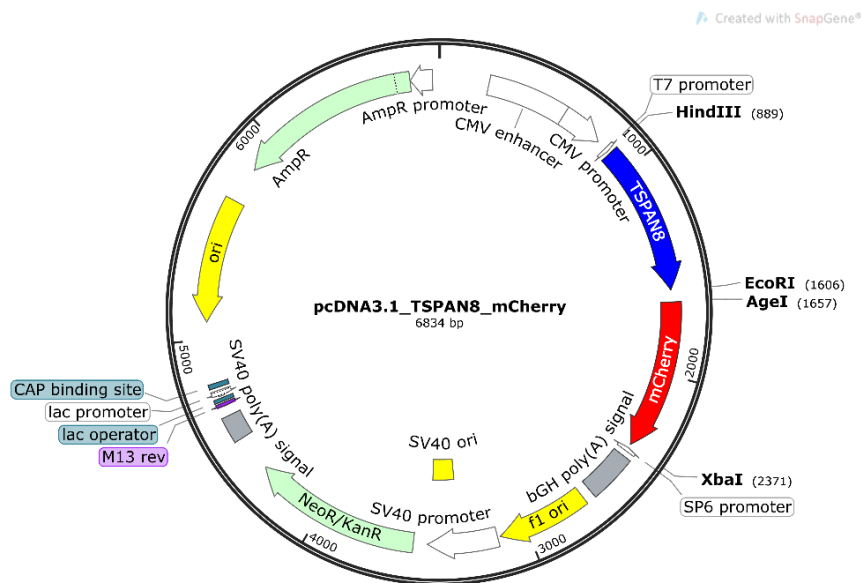
**Abbildung 71: Vektorkarte von pET303CTHis\_TSPAN8.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pET303CTHis\_TSPAN8. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für Tetraspanin-8 (TSPAN8) codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. TSPAN8 wurde über die Endonucleasen XbaI und NsiI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



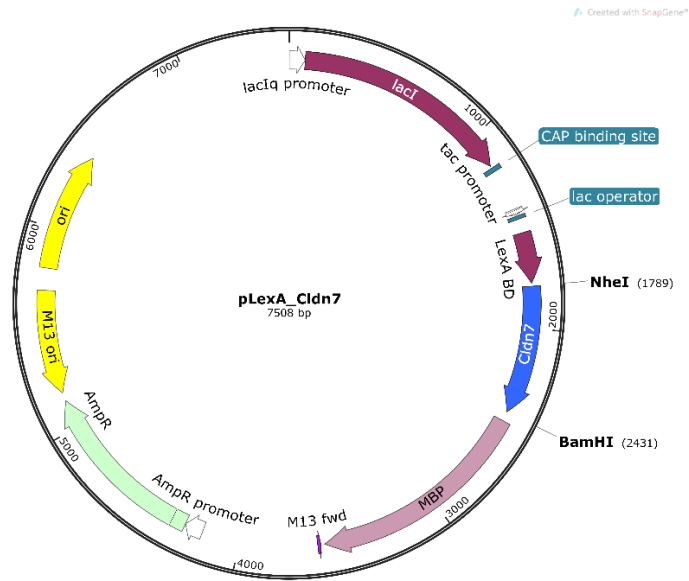
**Abbildung 72: Vektorkarte von pLexA\_TSPAN8.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pLexA\_TSPAN8. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für Tetraspanin-8 (TSPAN8) codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem tac-Promoter. TSPAN8 wurde über die Endonucleasen NheI und BamHI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



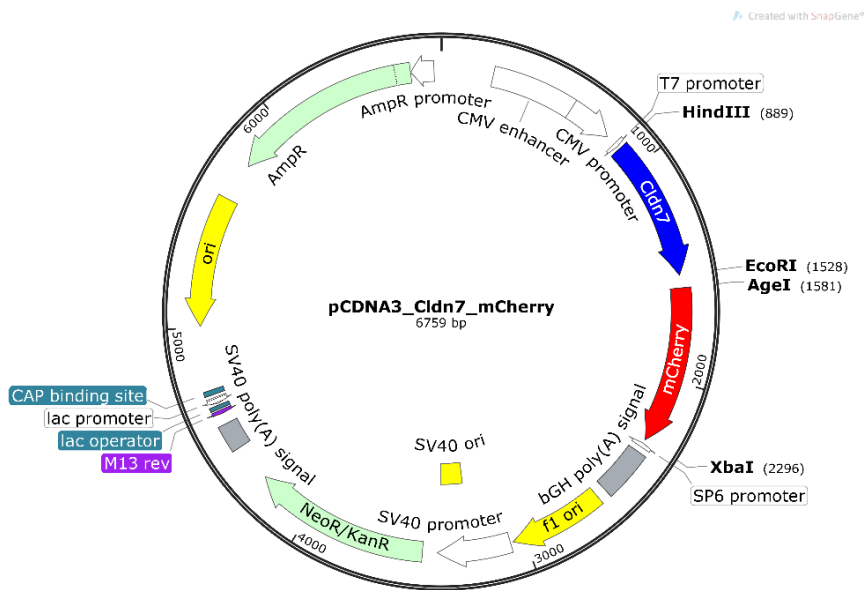
**Abbildung 73: Vektorkarte von pcDNA3.1\_TSPAN8\_mCherry.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pcDNA3.1\_TSPAN8\_mCherry. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- (AmpR, grün), eine Neomycin/Kanamycin-Resistenz (NeoR/KanR, grün). Der für Tetraspanin-8 (TSPAN8) codierende Bereich ist blau dargestellt, der für mCherry rot. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. TSPAN8 wurde über die Endonucleasen HindIII und EcoRI in den Vektor eingefügt. mCherry wurde über die Endonucleasen AgeI und XbaI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



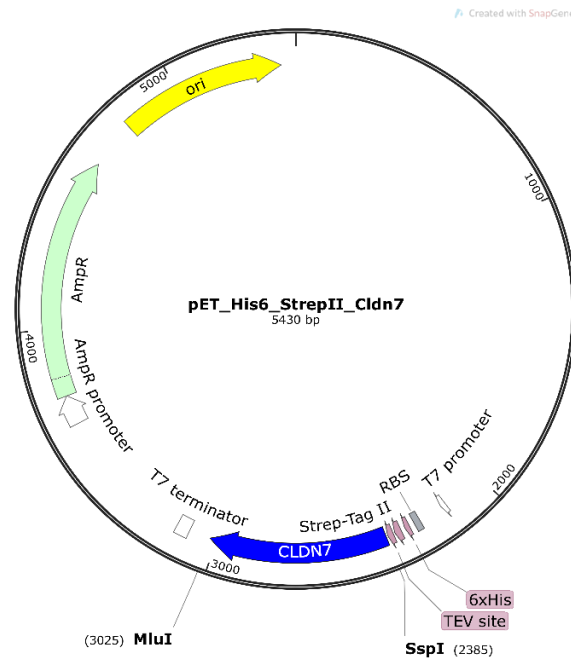
**Abbildung 74: Vektorkarte von pLexA\_Cldn7.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pLexA\_Cldn7. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (AmpR, grün). Der für Claudin-7 (Cldn7) codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem tac-Promoter. Das Claudin-7 Gen wurde über die Endonucleasen NheI und BamHI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].



**Abbildung 75: Vektorkarte von pcDNA3.1\_Cldn7\_mCherry.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pcDNA3.1\_Cldn7\_mCherry. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- (AmpR, grün), eine Neomycin/Kanamycin-Resistenz (NeoR/KanR, grün). Der für Claudin-7 (Cldn7) codierende Bereich ist blau dargestellt, der für mCherry rot. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. Das Claudin-7 Gen wurde über die Endonucleasen HindIII und EcoRI in den Vektor eingefügt. mCherry wurde über die Endonucleasen AgeI und XbaI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].

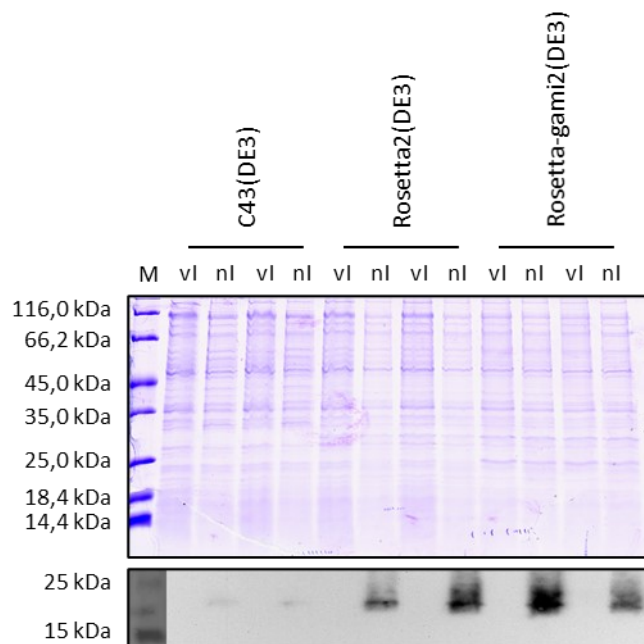


**Abbildung 76: Vektorkarte von pET\_His6\_StrepII\_Cldn7.**

Abgebildet ist die Vektorkarte von pET\_His6\_StrepII\_Cldn7. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- (AmpR, grün). Der für Claudin-7 (Cldn7) codierende Bereich ist blau dargestellt. Die Expression steht unter einem T7-Promoter. Das Claudin-7 Gen wurde über die Endonucleasen HindIII und EcoRI in den Vektor eingefügt. mCherry wurde über die Endonucleasen SspI und MluI in den Vektor eingefügt. Die Vektorkarte wurde mit SnapGene Viewer erstellt [253].

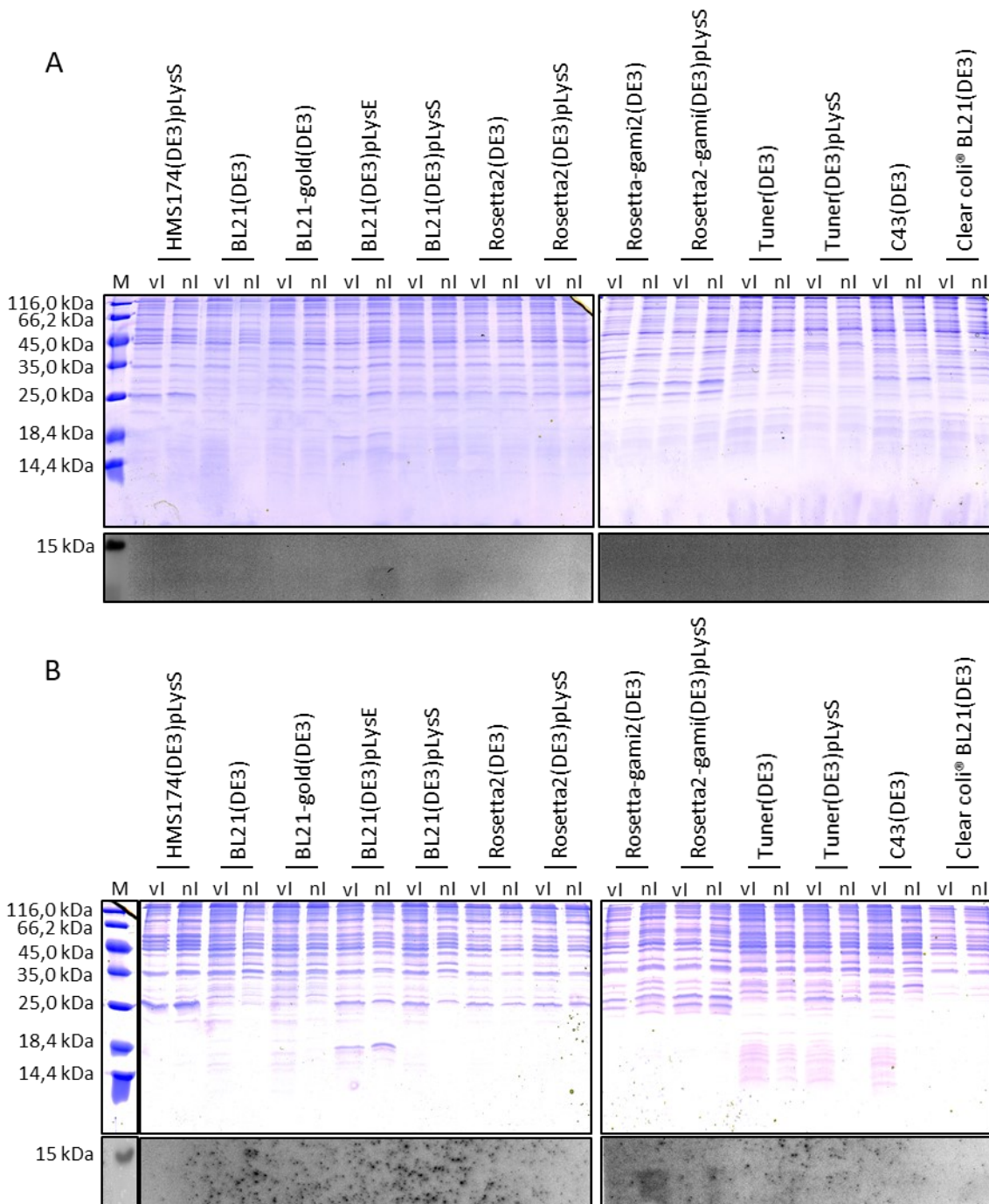
## 6.6 Zusätzliche Abbildungen

### 6.6.1 Slr0482 – CurT-ähnliches Protein



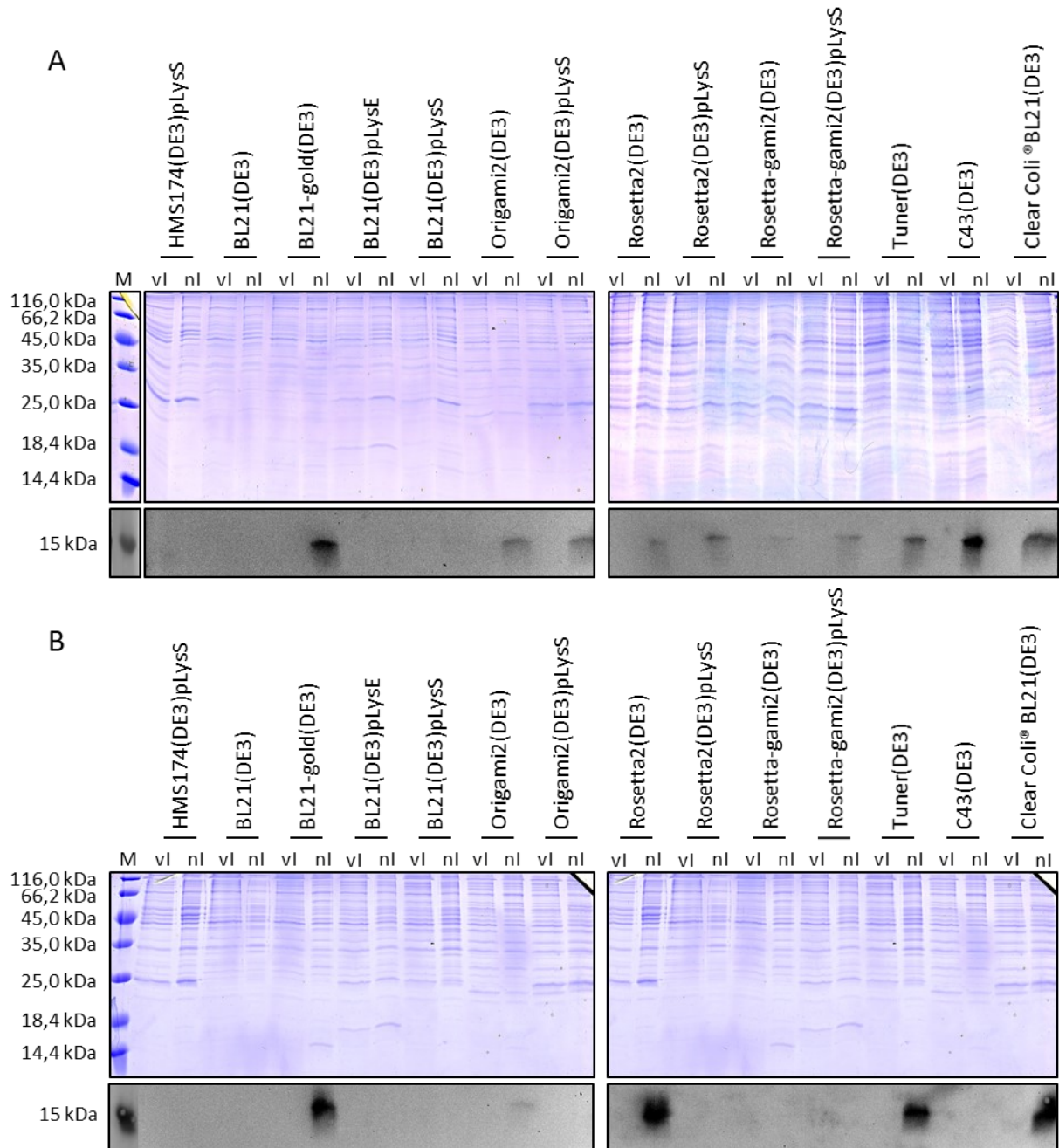
**Abbildung 77: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression von CurT.**

Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 14 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme Rosetta2(DE3), Rosetta-gami2(DE3) und C43(DE3). Die CurT-Bande wurde bei 16,5 kDa detektiert. Eine Expression von CurT konnte nur in den Stämmen Rosetta2(DE3) und Rosetta-gami2(DE3) beobachtet werden. In Rosetta-gami2(DE3) konnte die stärkste Expression detektiert werden. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion von CurT mit His-*tag*-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µL einer Probe mit  $OD_{600} = 0,5$ . Vom Marker (M) wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen.



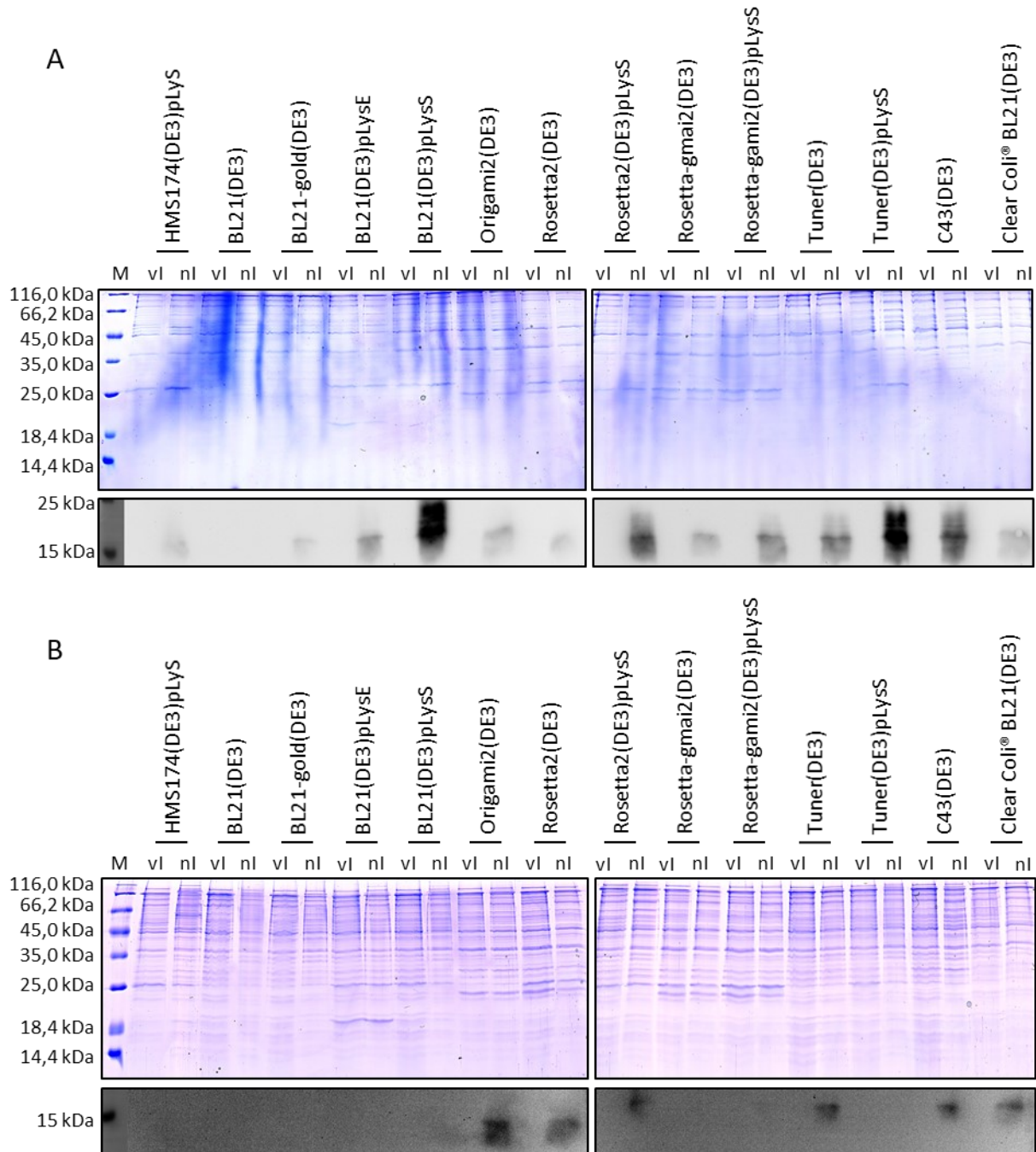
**Abbildung 78: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression des TM-Fragmentes von CurT.**

Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 18 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), Tuner(DE3)pLysS, C43(DE3) und Clear coli BL21(DE3). Das TM-Fragment besitzt eine Größe von 7 kDa. Nur bei einer Expression bei 20 °C (B) kann eine Expression des TM-Fragmentes im Stamm Rosetta-gami2(DE3) erkannt werden. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion des TM-Fragmentes von CurT mit His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µL einer Probe mit  $OD_{600} = 0,5$ . Vom Marker (M) wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen. (A) Expression des TM-Fragmentes von CurT nach Induktion mit IPTG für 3 h bei 37 °C. (B) Expression des TM-Fragmentes von CurT nach Induktion mit IPTG über Nacht bei 20 °C.



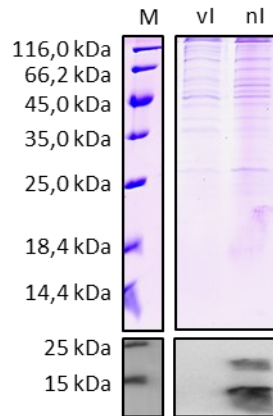
**Abbildung 79: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression des N-term-Fragmentes von CurT.**

Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 18 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), C43(DE3) und Clear Coli® BL21(DE3). Das N-term-Fragment konnte bei etwa 14 kDa detektiert werden. Eine Expression bei 37 °C konnte in den Stämmen BL21-gold(DE3), Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), C43(DE3) und Clear Coli® BL21(DE3) nachgewiesen werden. Bei einer Expression bei 20 °C konnte eine Expression des N-term-Fragmentes in den Stämmen BL21-gold(DE3), Rosetta2(DE3), Tuner(DE3) und Clear Coli® BL21(DE3) beobachtet werden. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion des N-term-Fragmentes von CurT mit His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µL einer Probe mit OD<sub>600</sub> = 0,5. Vom Marker (M) wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen. (A) Expression des N-term-Fragmentes von CurT nach Induktion mit IPTG für 3 h bei 37 °C. (B) Expression des N-term-Fragmentes von CurT nach Induktion mit IPTG über Nacht bei 20 °C.



**Abbildung 80: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression des C-term-Fragmentes von CurT.**

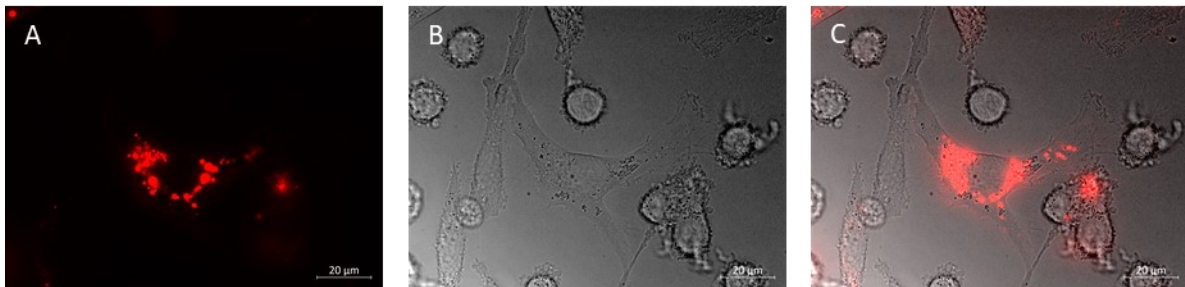
Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 18 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3), BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Origami2(DE3), Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gmai2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), Tuner(DE3)pLysS, C43(DE3) und Clear Coli®BL21(DE3). Das C-term-Fragment konnte bei etwa 10 kDa detektiert werden. Eine Expression bei 37 °C konnte in den Stämmen HMS174(DE3)pLysS, BL21-gold(DE3), BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)pLysS, Origami2(DE3), Origami2(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Rosetta-gami2(DE3), Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), C43(DE3) und Clear Coli®BL21(DE3) nachgewiesen werden. Bei einer Expression bei 20 °C konnte eine Expression des C-term-Fragmentes in den Stämmen Origami2(DE3), Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS, Tuner(DE3), C43(DE3) und Clear Coli®BL21(DE3) beobachtet werden. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion des C-term-Fragmentes von CurT mit His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µL einer Probe mit  $OD_{600} = 0,5$ . Vom Marker (M) wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen. (A) Expression des C-term-Fragmentes von CurT nach Induktion mit IPTG für 3 h bei 37 °C. (B) Expression des C-term-Fragmentes von CurT nach Induktion mit IPTG über Nacht bei 20 °C.



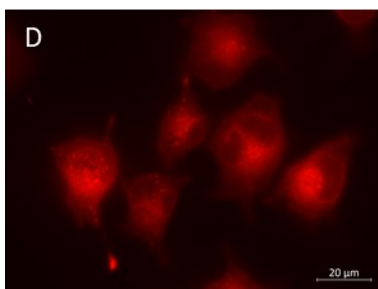
**Abbildung 81: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression des C-term-Fragmentes von CurT in Tuner(DE3)pLysS.** Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl) mit IPTG wurden in einem 18 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Das C-term-Fragment Monomer konnte bei 10 kDa detektiert werden. Des Weiteren wurde ein C-term-Fragment Dimer bei 20 kDa detektiert. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion von CurT mit His-Tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5  $\mu$ L einer Probe mit  $OD_{600} = 0,5$ . Vom Marker (M) wurden 5  $\mu$ L Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen.

## 6.6.2 Claudin-7

### L-cells

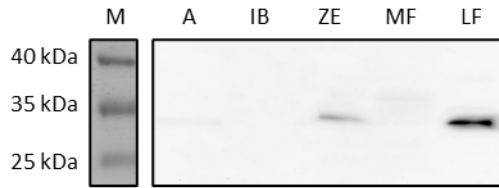


### HeLa



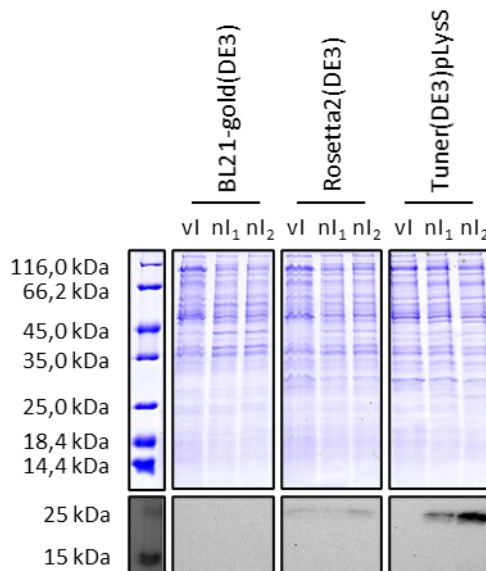
**Abbildung 82: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von L-cells und HeLa transfiziert mit mCherry-Konstrukten von Claudin-7.**

Expression von Claudin-7-mCherry in den Zelllinien L-cells und HeLa. Die Zellen wurden nach der Transfektion, unter Selektionsdruck gesetzt und anschließend für 60 h, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf einem Deckgläschen kultiviert. (A) Repräsentative Aufnahme der mCherry Fluoreszenz der transfizierten L-cells. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme derselben Zelle wie in (A). (C) Merge, Überlagerung von (A) und (B). Claudin-7 befindet sich in Einschlusskörperchen im Cytosol. (D) Repräsentative Aufnahme der mCherry Fluoreszenz der transfizierten HeLa-Zellen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop.



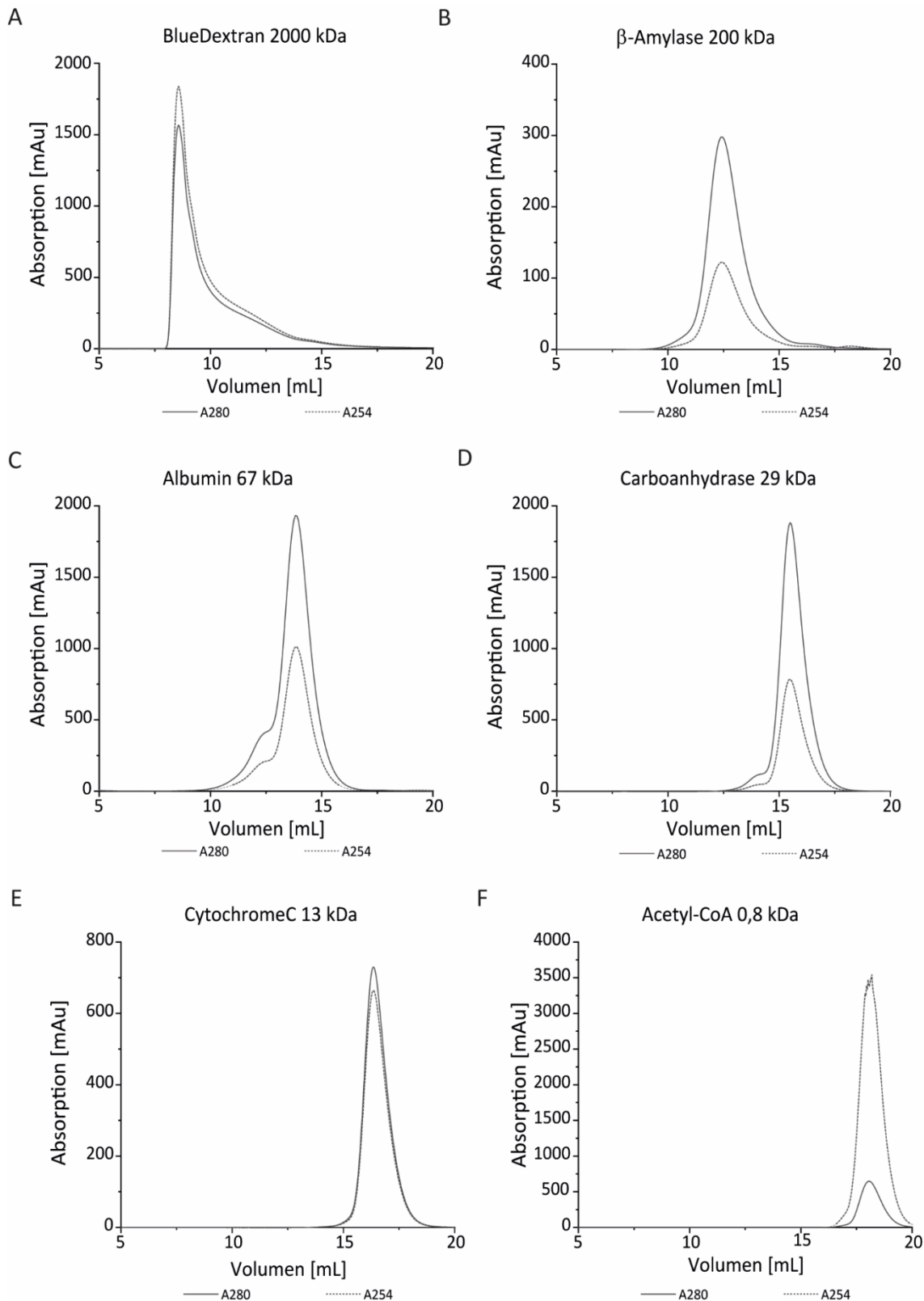
**Abbildung 83: Western Blot-Analyse der Membranpreparation von HEK293 transfiziert mit Claudin-7-FLAG.**

Aufgetragen auf ein 12 %iges SDS-Gel, wurden die Extrakte einer konfluenten 10 cm Gewebekulturschale von mit Claudin-7-FLAG transfizierten HEK293. In Spur A wurde der Aufschluss der Bakterien mittels Ultraschall aufgetragen, in Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, in Spur ZE das Zellextrakt, in Spur LF die lösliche Fraktion und in Spur MF die Membranfraktion. Die Claudin-7 Monomerbande wurde bei 26 kDa erwartet. Claudin-7 konnte nur im Zellextrakt und in der löslichen Fraktion detektiert werden. Eine Membranlokalisierung konnte nicht detektiert werden. Es wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels Anti-DDK (FLAG) monoclonal antibody (Maus, Origene, Rockville, MD, USA). Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus Antikörper, welcher POD gekoppelt war.



**Abbildung 84: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression von Claudin-7.**

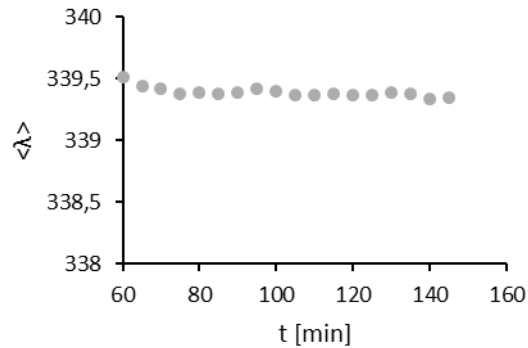
Proben des Gesamtzellextraktes vor (vl) und nach der Induktion (nl, je zwei Kolben Expressionskultur) mit IPTG wurden in einem 14 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Analysiert wurden die *E. coli*-Stämme BL21-gold(DE3), Rosetta2(DE3) und Tuner(DE3)pLysS. Die Claudin-7 Bande wurde bei etwa 26 kDa erwartet. Die größte Ausbeute konnte bei einer Expression in Tuner(DE3)pLysS erhalten werden. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie R-250 gefärbt. Nach dem Western Blot erfolgte eine Detektion von Claudin-7 mit His-tag-Antikörper. Aufgetragen wurden je 12,5 µL einer Probe mit OD<sub>600</sub> = 0,5. Vom Marker (M) wurden 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot aufgetragen.



**Abbildung 85: Chromatogramme der Kalibrierung von Superose 12 10/300 GL-Säule (GE Healthcare).**

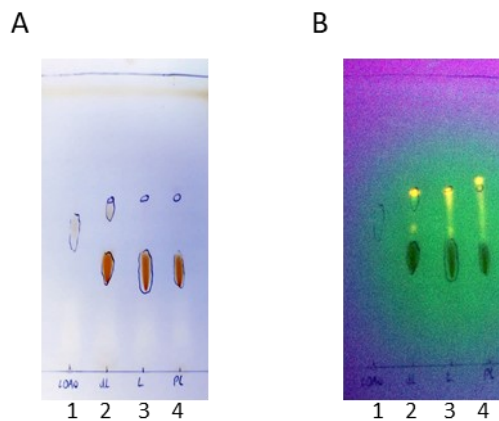
Eine Superose 12 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) wurde mit P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM äquilibriert. Es wurden je 0,5 mL der verschiedenen Proteine/Substanzen für die Größenausschlusschromatographie verwendet. Abgebildet wurde die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und bei 254 nm (gepunktete Linie). (A) Blue Dextran dient der Ermittlung des Ausschlussvolumens und besitzt eine Größe von 2000 kDa und wurde mit 8 mL eluiert. Es wurde mit einer Konzentration von 2 mg/mL aufgetragen. (B)  $\beta$ -Amylase ist etwa 200 kDa groß und wurde mit etwa 12 mL eluiert. Es wurde mit einer Konzentration von 1 mg/mL aufgetragen. (C) Albumin besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa und wurde mit etwa 14 mL eluiert. Es wurde mit einer Konzentration von 10 mg/mL aufgetragen. (D) Carboanhydrase hat ein Molekulargewicht von 29 kDa und wurde mit etwa 15,5 mL eluiert. Es wurde mit einer Konzentration von 3 mg/mL aufgetragen. (E) Cytochrom C ist

13 kDa groß und wurde bei etwa 16,5 mL eluiert. Es wurde mit einer Konzentration von 1 mg/mL aufgetragen. (F) Acetyl-Co besitzt ein Molekulargewicht von 0,8 kDa und wurde mit etwa 18 mL eluiert. Es wurde mit einer Konzentration von 0,6 mg/mL aufgetragen.



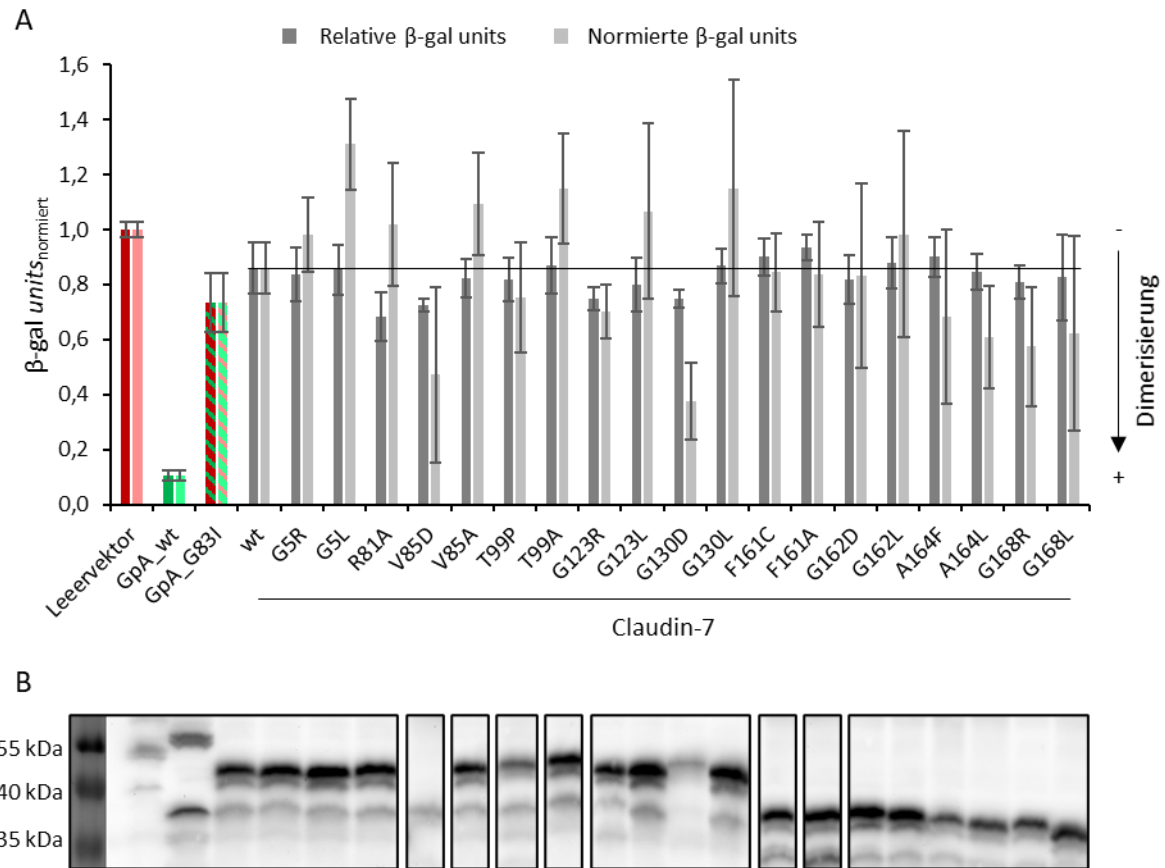
**Abbildung 86: Zeitaufgelöste Messung der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  von Claudin-7 bei  $\chi(\text{SDS}) = 0,36$ .**

Abgebildet wurde der Verlauf von  $\langle \lambda \rangle$  bei steigender Inkubationszeit mit SDS. Dabei wurde ein SDS-Molenbruch von 0,36 betrachtet. Auch bei einer Inkubation von 150 min konnte keine Veränderung der mittleren Wellenlänge beobachtet werden. Bei einer Inkubation von 60 min mit SDS liegen somit Gleichgewichtsbedingungen vor.

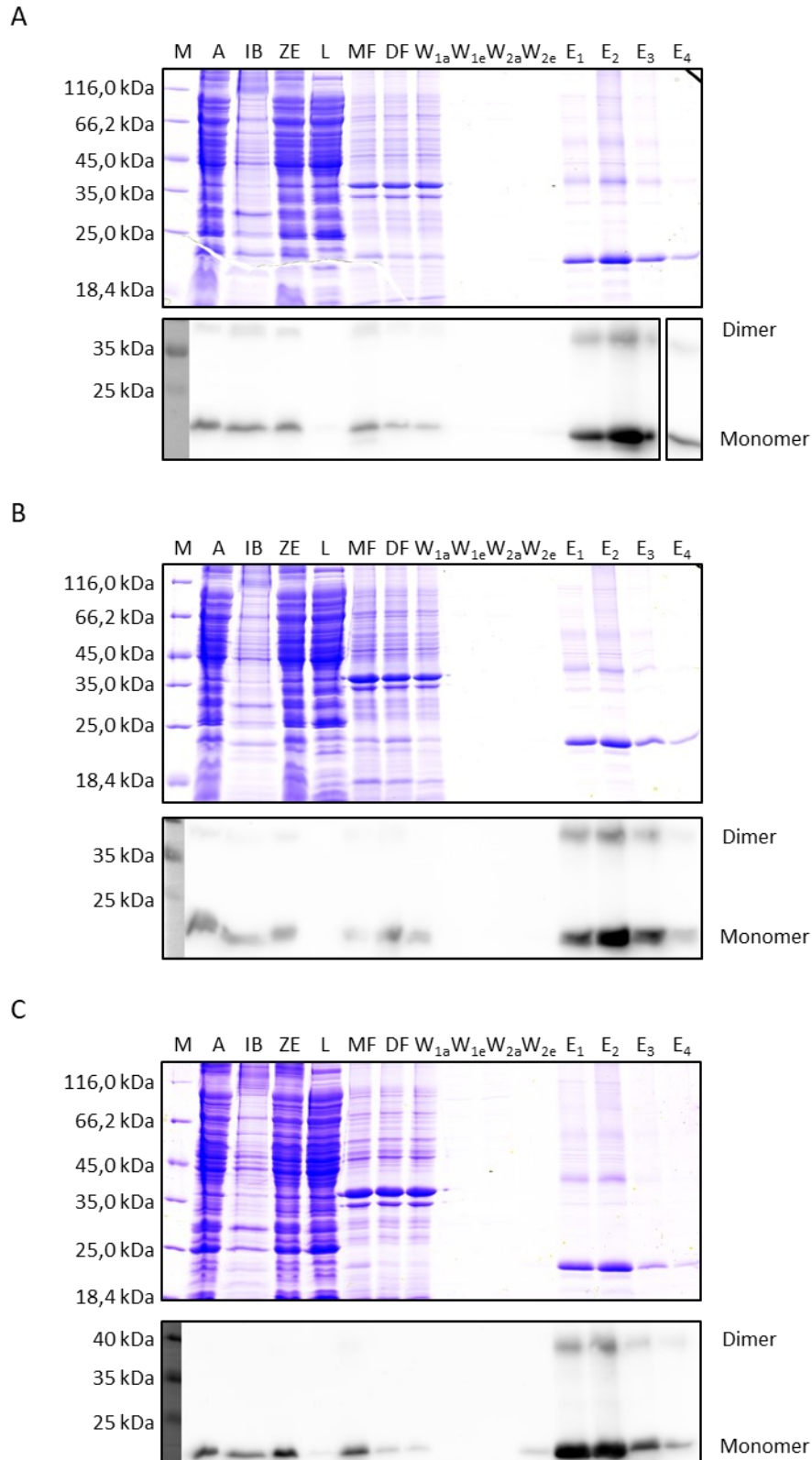


**Abbildung 87: Dünnschichtchromatographie (DC) der Proteoliposomen-Ansätze.**

Aufgetragen auf eine mit Kieselgel beschichtete DC-Platte (Silika Gel 60, Merck) wurden 5  $\mu\text{L}$  der Proben (1) 6 mM LDAO, (2) destabilisierte Liposomen, (3) Liposomen nach Dialyse und (4) Proteoliposomen nach Dialyse. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Chloroform:Methanol:Wasser (6,5:2,5:0,3). Detektiert wurden die Lipide und LDAO durch Iod-Dampf (A) bzw. unter UV-Licht (254 nm). LDAO kann nur in Spur (1) und (2) detektiert werden. In den Liposomen und Proteoliposomen nach der Dialyse konnte kein LDAO mehr detektiert werden. Bei der gelb leuchtenden Spur in (B) handelt es sich um LhissRhod-PE, welches in dem verwendeten Laufmittel schmiert.



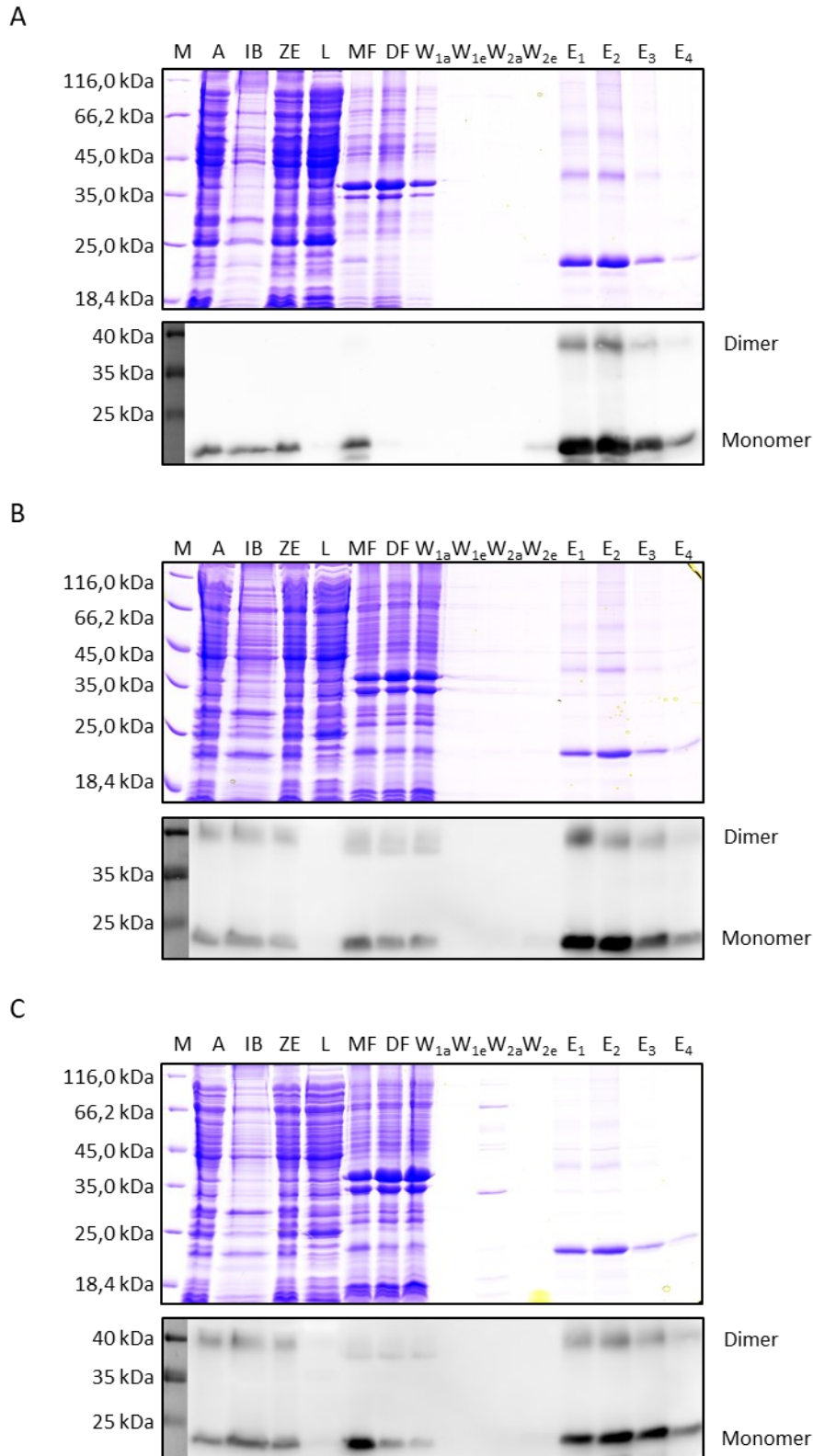
**Abbildung 88: Einfluss von krankheitsrelevanten Mutationen auf die Dimerisierung von Claudin-7 im GALLEX-Experiment.** Betrachtet wurde die Homodimerisierung und Expression von Claudin-7 im GALLEX-System. (A) Normierten  $\beta$ -gal units der *in vivo* Homodimerisierung von Claudin-7 und den krankheitsrelevanten Einfachmutanten in SU101-Bakterien ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung). Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMalp2. Als Positivkontrolle diente die Transmembranhelix des Glycophorin A (GpA). Die Mutante von GpA\_G83I (Glycin 83 zu Isoleucin) zeigt ein vermindertes Dimerisierungsverhalten. Die Normierung erfolgt auf den Mittelwert der Negativkontrolle und wird auf 1,0 gesetzt (dunkelgrau). Die  $\beta$ -gal units der Claudin-Proteine werden zusätzlich auf des Expressionsniveau des Wildtyps (wt) normiert (hellgrau). Die Schwarze-Linie dient zum besseren Vergleich mit dem Claudin-7 Wildtyp und ist auf Höhe dessen  $\beta$ -gal units. Die Mutanten V85D und G130D weisen eine bessere Dimerisierung als der Claudin-7 Wildtyp auf. Für alle weiteren Mutanten konnte kein Unterschied zum Wildtyp detektiert werden. (B) Western Blot-Analyse des SU101 NaOH-Extraktion zur Ermittlung des Expressionsniveaus. Dazu wurden Proben nach erfolgter Expression genommen, sodass eine  $OD_{600} = 1,0$  vorliegt. Die Bakterien wurden pelletiert und einer NaOH-Extraktion unterzogen. Von den verdauten Proben wurden  $10 \mu\text{L}$  auf ein SDS-Gel geladen und einer Western Blot-Analyse durchgeführt. Vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) wurden  $5 \mu\text{L}$  aufgetragen. Als Erstantikörper diente LexA DNA Binding Region Antikörper, als Zweitantikörper wurde Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase verwendet.



**Abbildung 89: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie der Claudin-7 Mutanten V70A (A), R81A (B) und F148A (C).**

Aufgetragen auf ein 12 %iges SDS-Gel, wurden je 50 µg Gesamtprotein der Proben des Proteinaufschlusses (Spur A, IB, ZE, L, MF) und mit dem Volumen der Membranfraktion (MF, 12 µL) die Proben der Proteinreinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie. In Spur A wurde der Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer aufgetragen, in Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, in Spur ZE das Zellextrakt, in Spur L die lösliche Fraktion und in Spur MF die solubilisierte Membranfraktion. In Spur DF wurde anschließend der Durchfluss der Ni-NTA-Agarose Säule aufgetragen. Nun folgen zwei Waschschritte, wobei jeweils eine Probe vom Anfang der Waschung <sub>a</sub> und vom Ende der

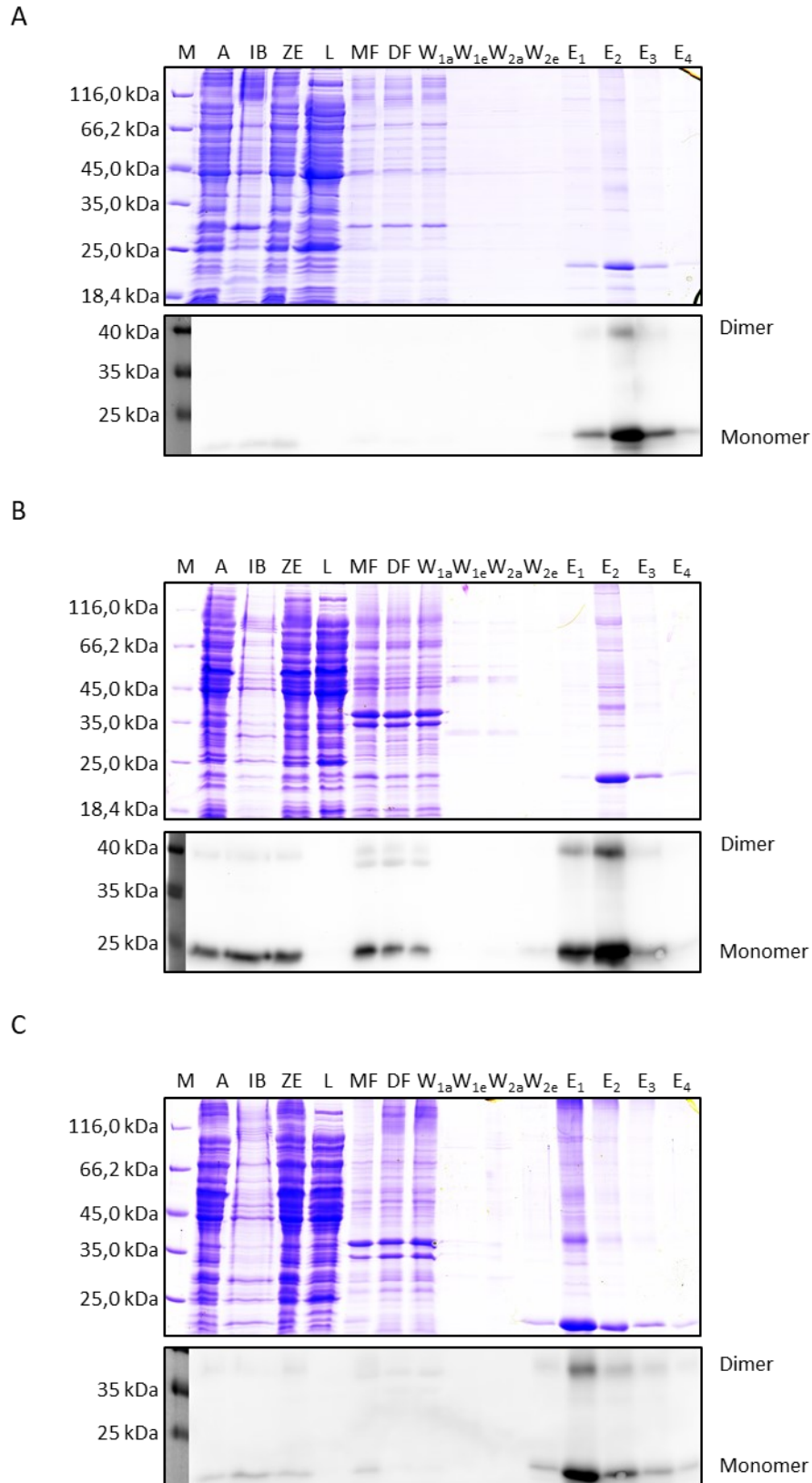
Waschung e aufgetragen wurden.  $W_1$  entspricht 5 mM Imidazol und  $W_2$  50 mM. Anschließend wurde in 2 mL-Schritten mit 500 mM Imidazol Claudin-7 von der Säule eluiert (Spur E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>). Die Claudin-7 Monomerbande wurde bei 26 kDa erwartet, das Dimer bei 52 kDa. Die Claudin-7 Mutanten konnte mit hohem Reinheitsgrad erhalten werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.



**Abbildung 90: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie der Claudin-7 Mutanten Y149A (A), E160A (B) und F161A (C).**

Aufgetragen auf ein 12 %iges SDS-Gel, wurden je 50 µg Gesamtprotein der Proben des Proteinaufschlusses (Spur A, IB, ZE, L, MF) und mit dem Volumen der Membranfraktion (MF, 12 µL) die Proben der Proteinreinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie. In Spur A wurde der Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer aufgetragen, in Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, in Spur ZE das Zellextrakt, in Spur L die lösliche Fraktion und in Spur MF die solubilisierte Membranfraktion. In Spur DF wurde anschließend der Durchfluss der Ni-NTA-Agarose Säule aufgetragen. Nun folgen zwei Waschschritte, wobei jeweils eine Probe vom Anfang der Waschung <sub>a</sub> und vom Ende der Waschung <sub>e</sub> aufgetragen wurden. W<sub>1</sub> entspricht 5 mM Imidazol und W<sub>2</sub> 50 mM. Anschließend wurde in 2 mL-Schritten mit

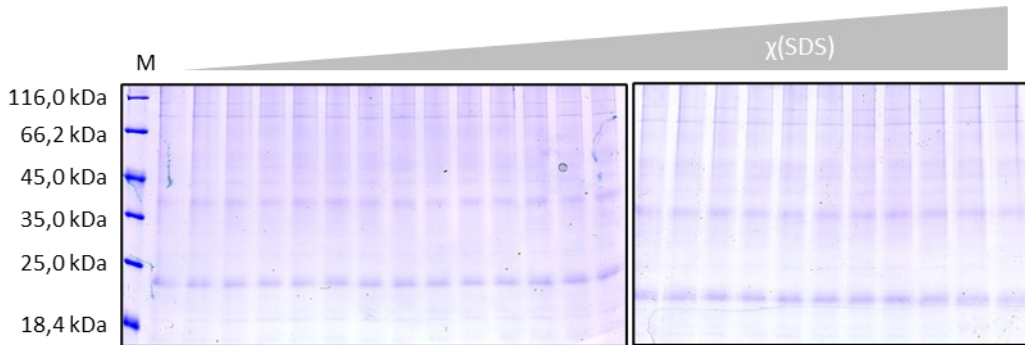
500 mM Imidazol Claudin-7 von der Säule eluiert (Spur E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>). Die Claudin-7 Monomerbande wurde bei 26 kDa erwartet, das Dimer bei 52 kDa. Die Claudin-7 Mutanten konnte mit hohem Reinheitsgrad erhalten werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.



**Abbildung 91: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie der Claudin-7 Mutanten Claudin-7\* (A), Claudin-7' (B) und R81A\_Y149A (C).**

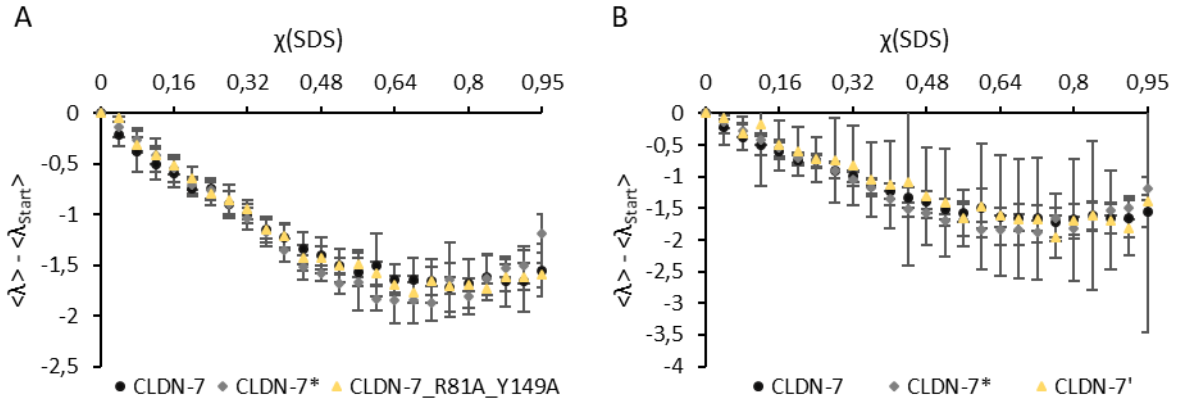
Aufgetragen auf ein 12 %iges SDS-Gel, wurden je 50 µg Gesamtprotein der Proben des Proteinaufschlusses (Spur A, IB, ZE, L, MF) und mit dem Volumen der Membranfraktion (MF, 12 µL) die Proben der Proteinreinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie. In Spur A wurde der Aufschluss der Bakterien mittels Microfluidizer aufgetragen, in Spur IB die abgetrennten Einschlusskörperchen und nicht aufgebrochenen Zellen, in Spur ZE das Zellextrakt, in Spur L die lösliche Fraktion und in Spur MF die solubilisierte Membranfraktion. In Spur DF wurde anschließend der Durchfluss der Ni-NTA-Agarose Säule

aufgetragen. Nun folgen zwei Waschschritte, wobei jeweils eine Probe vom Anfang der Waschung  $a$  und vom Ende der Waschung  $e$  aufgetragen wurden.  $W_1$  entspricht 5 mM Imidazol und  $W_2$  50 mM. Anschließend wurde in 2 mL-Schritten mit 500 mM Imidazol Claudin-7 von der Säule eluiert (Spur E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>). Die Claudin-7 Monomerbande wurde bei 26 kDa erwartet, das Dimer bei 52 kDa. Die Claudin-7 Mutanten konnte mit hohem Reinheitsgrad erhalten werden. Es wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE, bzw PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Western Blot verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels His-tag-Antikörper.



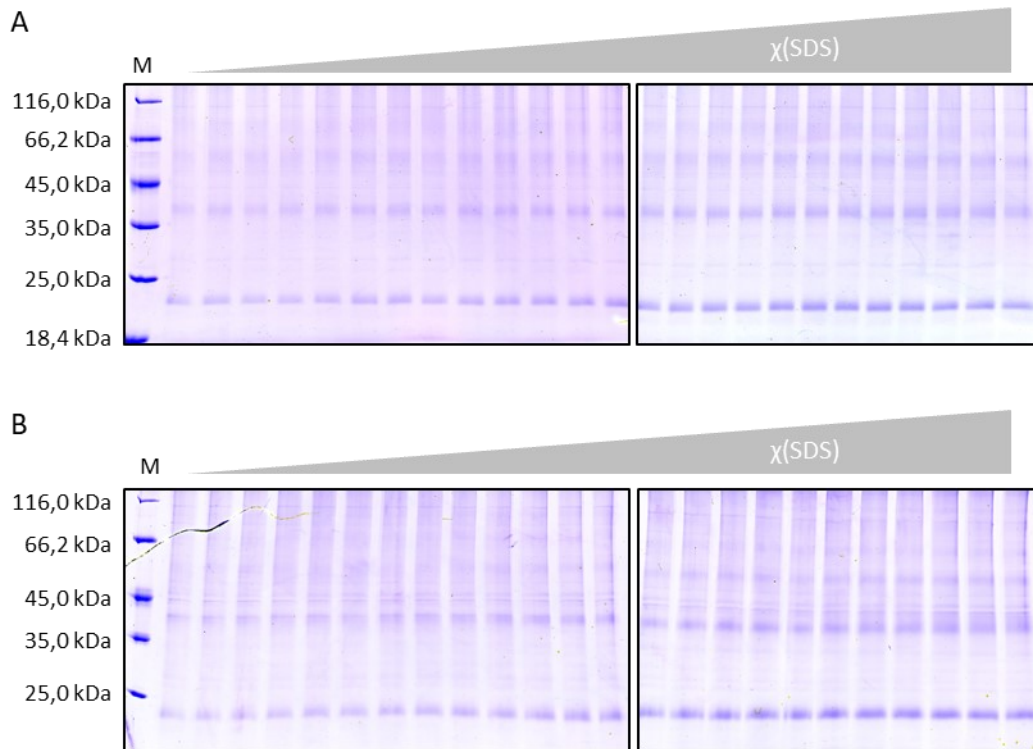
**Abbildung 92: SDS-PAGE-Analyse des Einflusses von SDS auf die Oligomerbildung von Claudin-7\*.**

SDS-PAGE-Analyse der Claudin-7\* Proben mit ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Es wurden 12  $\mu\text{L}$  Probe aus den Titrationsansätzen mit 3  $\mu\text{L}$  5x Probenpuffer ohne SDS versetzt. Diese Proben wurden in einem 12 %igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es konnte kein Unterschied im Bandenmuster von Claudin-7\* bei steigendem  $\chi(\text{SDS})$  beobachtet werden. Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.



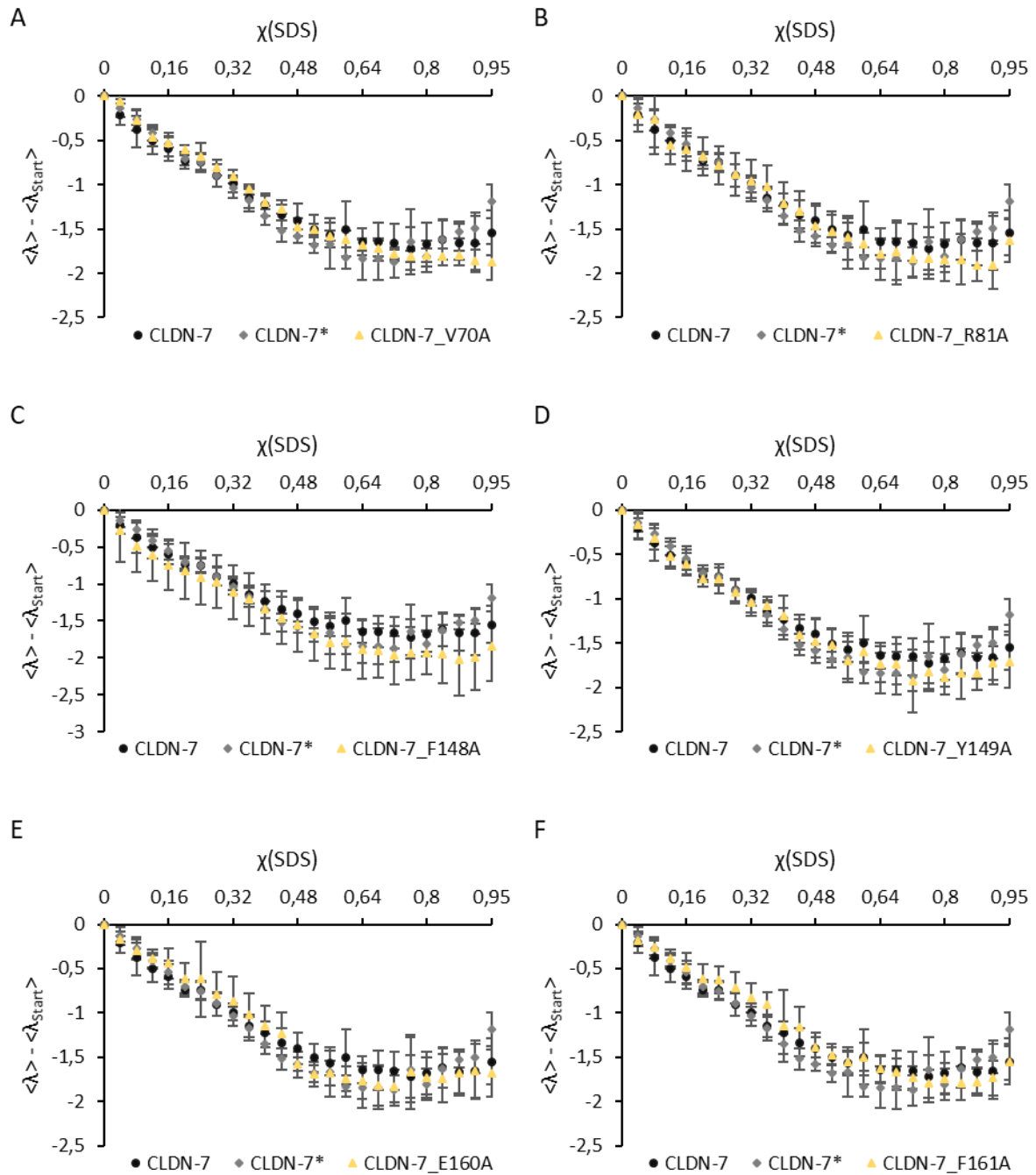
**Abbildung 93: Betrachtung der Entfaltung von Claudin-7, Claudin-7\*, Claudin-7' und Claudin-7\_R81A\_Y149A über die Differenz der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle - \langle \lambda \rangle_{\text{start}}$ .**

Verlauf der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  von Claudin-7 (CLDN-7, Schwarz), Claudin-7\* (CLDN-7\*, Grau) und Claudin-7\_R81A\_Y149A (CLDN-7\_R81A\_Y149A, Gelb, A), bzw. Claudin-7' (CLDN-7', Gelb, B) bei ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Die mittlere Wellenlänge nimmt dabei bis zu einem  $\chi(\text{SDS})$  von 0,6 ab und bleibt dann konstant. Die Tryptophan-Seitenketten werden in eine hydrophobere Umgebung exponiert ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung).



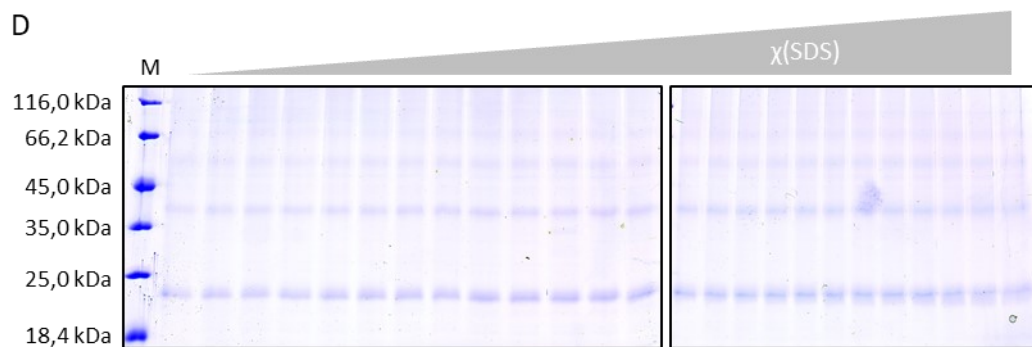
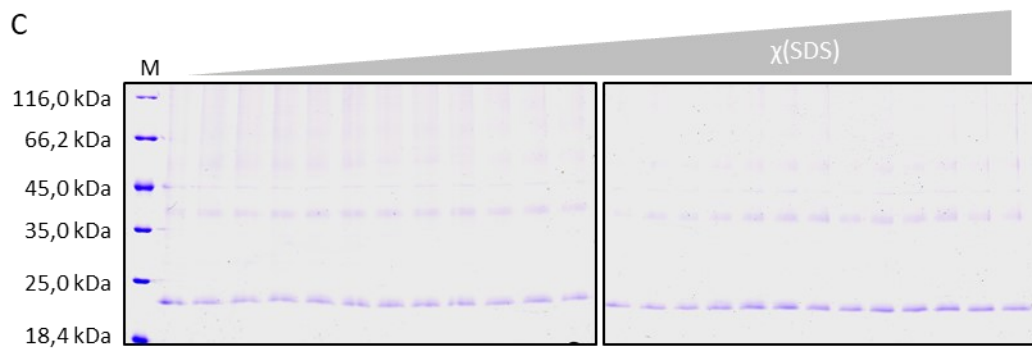
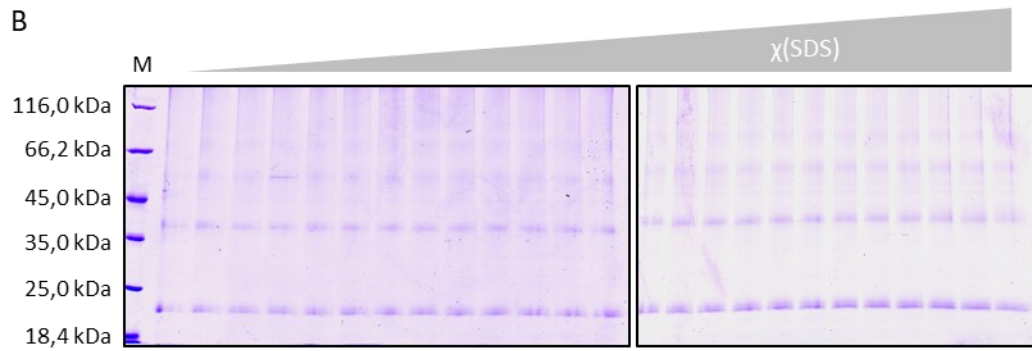
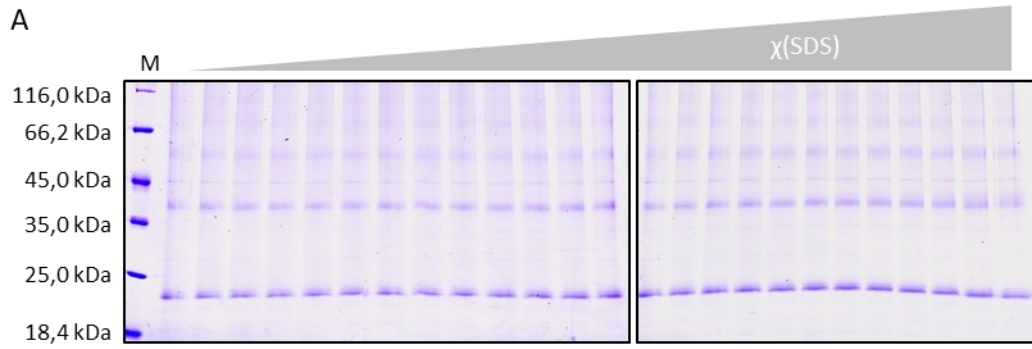
**Abbildung 94: SDS-PAGE-Analyse des Einflusses von SDS auf die Oligomerbildung von Claudin-7\_R81A\_Y149A (A) und Claudin-7' (B).**

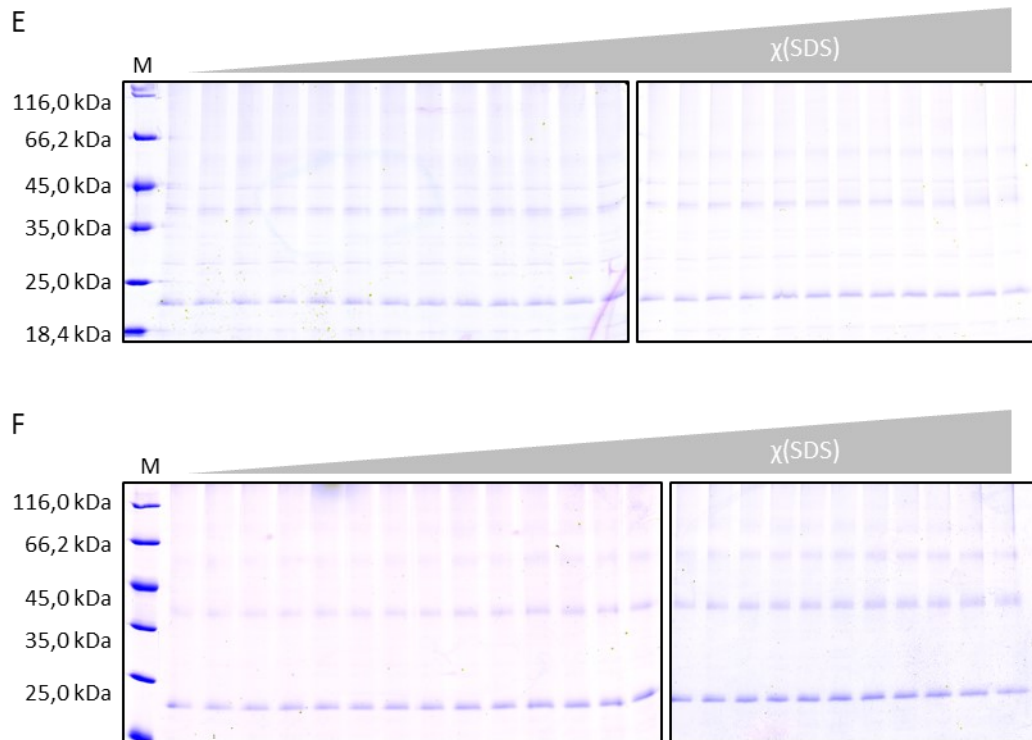
SDS-PAGE-Analyse der Claudin-7\_R81A\_Y149A und Claudin-7' Proben mit ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Es wurden 12  $\mu\text{L}$  Probe aus den Titrationsansätzen mit 3  $\mu\text{L}$  5x Probenpuffer ohne SDS versetzt. Diese Proben wurden in einem 12 %igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es konnte kein Unterschied im Bandenmuster von Claudin-7\* bei steigendem  $\chi(\text{SDS})$  beobachtet werden. Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.



**Abbildung 95: Betrachtung der Entfaltung von Claudin-7, Claudin-7\*, Claudin-7\_V70A (A), Claudin-7\_R81A (B), Claudin-7\_F148A (C), Claudin-7\_Y149A (D), Claudin-7\_E160A (E) und Claudin-7\_F161A (F) über die Differenz der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle - \langle \lambda \rangle_{\text{start}}$ .**

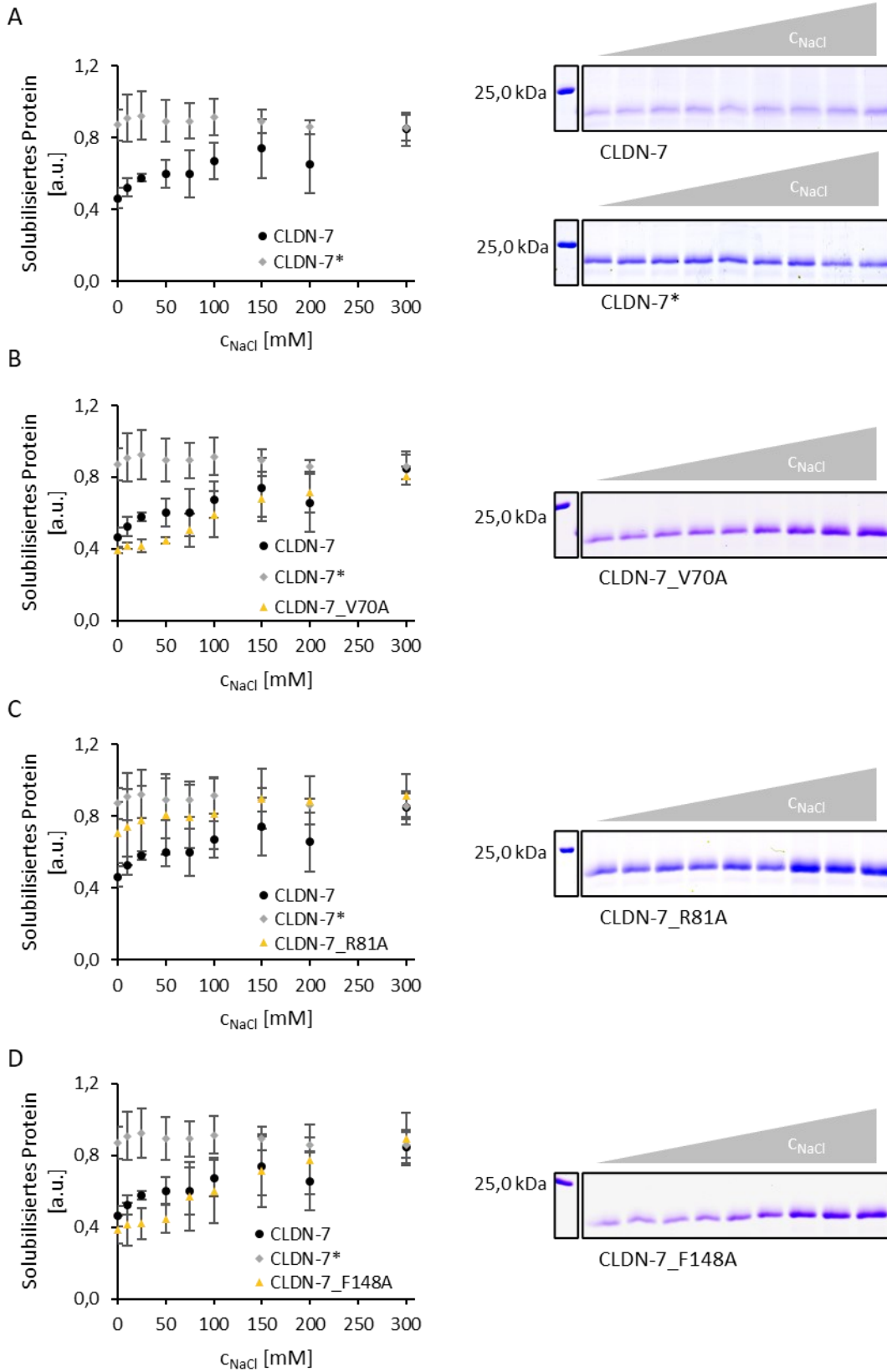
Verlauf der mittleren Wellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  von Claudin-7 (CLDN-7, Schwarz), Claudin-7\* (CLDN-7\*, Grau) und der jeweiligen Mutante in Gelb bei ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Die mittlere Wellenlänge nimmt dabei bis zu einem  $\chi(\text{SDS})$  von 0,6 ab und bleibt dann konstant. Die Tryptophan-Seitenketten werden in eine hydrophobere Umgebung exponiert ( $n = 9 \pm$  Standardabweichung).

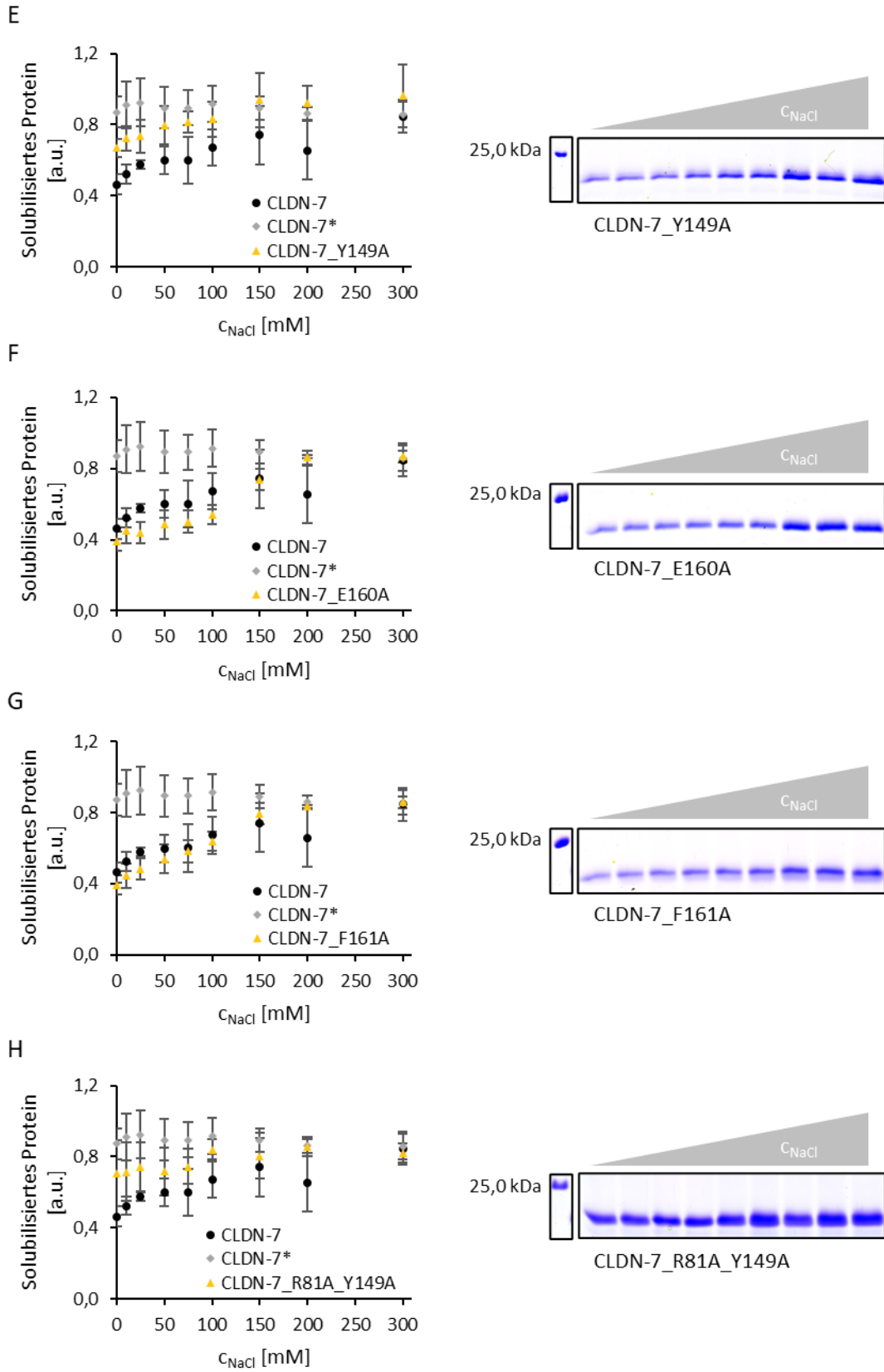


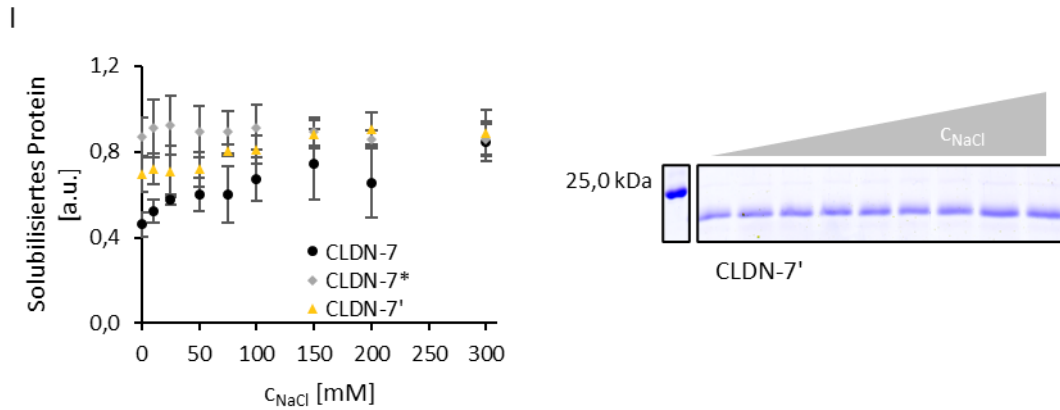


**Abbildung 96: SDS-PAGE-Analyse des Einflusses von SDS auf die Oligomerbildung von Claudin-7\_V70A (A), Claudin-7\_R81A (B), Claudin-7\_F148A (C), Claudin-7\_Y149A (D), Claudin-7\_E160A (E) und Claudin-7\_F161A (F).**

SDS-PAGE-Analyse der Claudin-7\_R81A\_Y149A und Claudin-7' Proben mit ansteigendem  $\chi(\text{SDS})$ . Es wurden 12  $\mu\text{L}$  Probe aus den Titrationsansätzen mit 3  $\mu\text{L}$  5x Probenpuffer ohne SDS versetzt. Diese Proben wurden in einem 12 %igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es konnte kein Unterschied im Bandenmuster von Claudin-7\* bei steigendem  $\chi(\text{SDS})$  beobachtet werden. Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.







**Abbildung 97: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Claudin-7, sowie den Interaktionsmutanten.**

Es wurde eine Proteinreinigung mittels IMAC in P-Puffer (Tabelle 1) mit 5 mM DDM durchgeführt. Das erhaltene Eluat wurde aufgeteilt und in die Puffer S1-S10 dialysiert. S1 entspricht dabei dem Reinigungspuffer, S2 besitzt kein Glycerol, die Puffer S3 bis S9 besitzen eine sinkende NaCl-Konzentration (200 mM, 150 mM, 100 mM, 75 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM) und Puffer S10 ist nur noch 50 mM Phosphat, pH 8. (Links) Anteil an solubilisierten Claudin-7 (CLDN-7, Schwarz), Claudin-7\* (CLDN-7\*, Grau) und der jeweilige Mutante (Gelb) in Abhängigkeit der Salzkonzentration. (A) Claudin-7 (CLDN-7) und Claudin 7\* (CLDN-7\*) (B) Claudin-7-V70A (CLDN-7\_V70A) (C) Claudin-7-R81A (CLDN-7\_R81A) (D) Claudin-7-F148A (CLDN-7\_F148A) (E) Claudin-7-Y149A (CLDN-7\_Y149A) (F) Claudin-7-E160A (CLDN-7\_E160A) (G) Claudin-7-F161A (CLDN-7\_F161A) (H) Claudin-7-R81A-Y149A (CLDN-7\_R81A\_F149A) (I) Claudin-7' (CLDN-7'). Die erhaltenen Werte stammen aus der *ImageJ*-Auswertung [128] der Claudin-7 Monomerbande einer SDS-PAGE-Analyse des Überstandes, nach einer Zentrifugation, nach der Dialyse in den entsprechenden Puffer. Dabei wurde die Probe der Dialyse in S1/Reinigungspuffer auf 1 normiert. Diese SDS-PAGE Analyse ist immer links neben der *ImageJ*-Auswertung [128] abgebildet ( $n = 3 \pm$  Standardabweichung, repräsentative Acrylamidgelle). Die Proben wurden in einem 12%igen Acrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Aufgetragen wurden 10  $\mu\text{L}$  der genommenen Probe nach der Dialyse. Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Unstained Protein Molecular Weight Marker für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-R250 gefärbt.