

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

**Charakterisierung interagierender Proteine des
renalen ATP- abhängigen Kaliumkanals ROMK**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Hans Ulrich Kerl
aus Weißenburg

Würzburg, Oktober 2004

Referent:

Prof. Dr. med. A. Schwab

Korreferent:

Prof. Dr. med. M. Gekle

Dekan:

Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2005

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
1 Einleitung	1
1.1 Die physiologische Rolle von Kalium	1
1.2 Kaliumkanäle der Niere und ihre Funktion	2
1.3 Der ATP-abhängige Kaliumkanal ROMK	5
1.3.1 ROMK- Struktur und Aufbau	5
1.3.2 Kanalisformen und Lokalisation.....	6
1.3.3 Die Regulation von ROMK	7
1.3.4 Mögliche Interaktionspartner von ROMK- Kanälen	8
1.4 Vorarbeiten	9
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	12
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	17
2.1.3 Molekularbiologie	20
2.1.4 Zellkultur	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Arbeiten mit DNA	25
2.2.2 PCR	28
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	29
2.2.4 Zellkultur	31
2.2.5 Immunfluoreszenz	32
3 Versuche und Ergebnisse	33
3.1 cDNA- Konstrukte für die Überprüfung von Protein-Protein Wechselwirkungen	33
3.2 Der ROMK-GST „Pull-Down“	42
3.2.1 Konstruktion des ROMK-GST Fusionsproteins	42
3.2.2 Expression und Extraktion des Fusionsproteins	43
3.2.3 Durchführung des GST Pulldown	45
3.3 Der ROMK-HIS „Pull-Down“	47
3.3.1 Konstruktion des ROMK-HIS-Fusionsproteins.....	47
3.3.2 Expression und Extraktion des Fusionsproteins	48
3.3.3 Durchführung des HIS Pulldown.....	49
3.4 Kolokalisationsstudie mittels Immunfluoreszenz	51
4 Diskussion	56

5	<i>Zusammenfassung</i>	66
6	<i>Literatur</i>	67

1 Einleitung

1.1 Die physiologische Rolle von Kalium

Kalium ist ein Kation, das im Körper eine tragende Rolle für die Funktionsfähigkeit aller Zellen hat. Es macht 70 % der positiven Ionen in der Zelle aus und kommt im Zellinneren in sehr hoher (155 mmol/l), außerhalb der Zellen jedoch nur in sehr niedriger (4 mmol/l) Konzentration vor. Dieses Ungleichgewicht ist eine der entscheidenden Voraussetzungen für die Entstehung des Membranpotenzials und steuert damit die Reizleitung der Nerven sowie in Verbindung mit Kalzium die Fähigkeit zur Kontraktion von Skelett-, Herz- und Gefäßmuskulatur.

Die Erregbarkeit der Nerven- und Muskelzellen ist jedoch nur dann optimal gewährleistet, wenn die intrazelluläre K^+ -Konzentration in sehr engen Grenzen gehalten wird. Das ist eine der wichtigsten Aufgaben der Niere. Sie reguliert den Kaliumhaushalt unter Berücksichtigung der täglichen Salz-, Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme [1, 2]. Die entscheidende Rolle der Niere für das Kaliumgleichgewicht liegt in der Fähigkeit, effektiv auf Änderungen der externen Kaliumbalance zu reagieren und die extrazelluläre Konzentration von Kalium zu stabilisieren. So können bei Bedarf 98% des filtrierten Kaliums resorbiert oder das Doppelte der filtrierten Menge sezerniert werden. Diese Anpassung an den Bedarf geschieht v.a. im distalen Tubulus und im Sammelrohr. Dabei spielen die K^+ -Kanäle (u.a. auch ROMK) eine entscheidende Rolle.

1.2 Kaliumkanäle der Niere und ihre Funktion

Die physiologische Funktion der renalen Kaliumkanäle

1. Aufrechterhaltung des negativen Membranpotenzials der Tubuluszellen

Das negative Membranpotenzial aller Tubuluszellen entlang des Nephrons basiert auf einer hohen K^+ -Leitfähigkeit der apikalen bzw. basolateralen Membran, die mit dem oben bezeichneten Konzentrationsgradienten für K^+ -Ionen zwischen Intra- und Extrazellulärraum gekoppelt ist [1, 5]. Der Kaliumkonzentrationsgradient wird durch die basolateral gelegene Na^+ - K^+ -ATPase aufrechterhalten. Verschiedene Klassen von K^+ -Kanälen wurden entdeckt, die den K^+ -Leitfähigkeiten der apikalen und basolateralen Membran zugrunde liegen [1, 5]. Das negative Membranpotenzial liefert die elektrische Triebkraft für eine Reihe von Transportern (z.B. Na^+ -Glukose-Kotransporter im proximalen Tubulus) [6]. Darüber hinaus tragen die K^+ -Kanäle auch zur Generierung eines transepithelialen Potenzials bei, das die elektrische Triebkraft für einen transepithelialen Transport liefert [7].

2. Rezirkulation von Kalium über die apikale Membran

Sekretorische Kaliumkanäle der Niere, wie ROMK, liegen in der apikalen Membran des kortikalen und medullären Teils des dicken Astes der aufsteigenden Henleschen Schleife. Sie bilden die Ausflussbahn für Kalium von der Zelle ins Lumen und verrichten zwei Hauptaufgaben: Zum einen sind sie für das Funktionieren des Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Kotransporters erforderlich. Zum anderen tragen Kaliumkanäle des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife zum Aufbau eines lumen-positiven transepithelialen

Potenzials bei, was u.a. für die parazelluläre Resorption von Mg^{2+} und Ca^{2+} erforderlich ist [1, 5, 8-10].

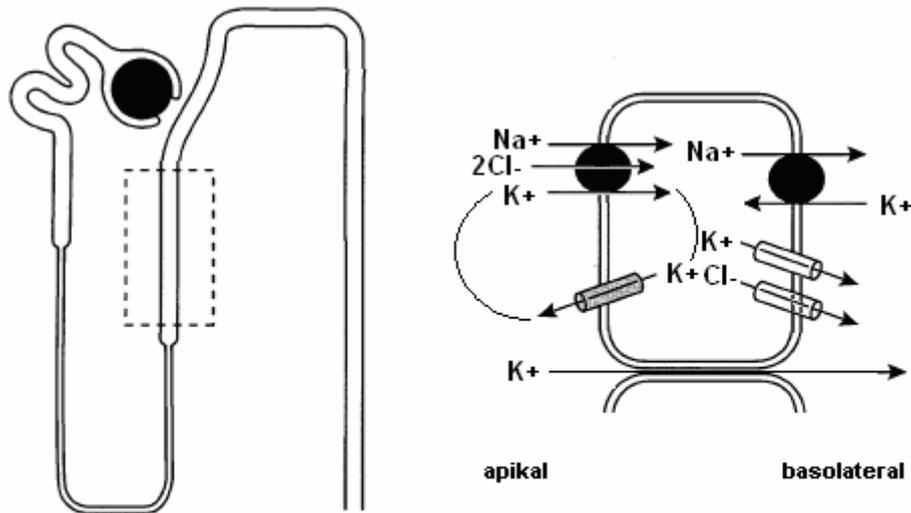


Abbildung 1: Zelluläre Mechanismen des renalen Kaliumtransports im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife

Im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife wird Kalium durch den apikalen $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter in die Zelle aufgenommen. In der apikalen Membran befindet sich ein K^+ -Kanal (z.B. ROMK), durch den Kalium die Zelle verlässt und dabei eine für dieses Segment typische lumen-positive transepitheliale Spannung verursacht. Auf der basolateralen Seite befindet sich außer der Na^+K^+ -ATPase möglicherweise ein K^+Cl^- -Kotransporter, der beide Ionen aus der Zelle herustransportieren kann. Die lumen-positive Spannung treibt eine K^+ -Resorption auf dem parazellulären Weg.

3. Kaliumsekretion am Sammelrohr

Der Hauptmechanismus für die renale Exkretion von Kalium ist dessen regulierte Sekretion durch die Hauptzellen des kortikalen und medullären Sammelrohrs [5, 11]. Die Natriumkanäle in der apikalen Membran dieser Zellen spielen dabei eine wichtige modulierende Rolle. Der Natriumeinstrom depolarisiert nämlich das apikale Membranpotenzial und „entfernt“ es damit vom K^+ -Gleichgewichtspotenzial. Je stärker also der Na^+ -Einstrom ist, desto größer ist die Triebkraft für den K^+ -Ausstrom aus der Zelle ins Tubuluslumen. Um eine effektive K^+ -Sekretion zu ermöglichen, muss daher die Aktivität sowohl der Na^+ - als auch der K^+ -Kanäle gesteigert werden. Genau diesen Effekt hat Aldosteron auf die Hauptzellen des Sammelrohrs. Das Hormon erhöht die Aktivität von Natrium- und Kaliumkanälen und stimuliert somit die Na^+ -Resorption und K^+ -Sekretion in diesen Nephronabschnitten [12, 13].

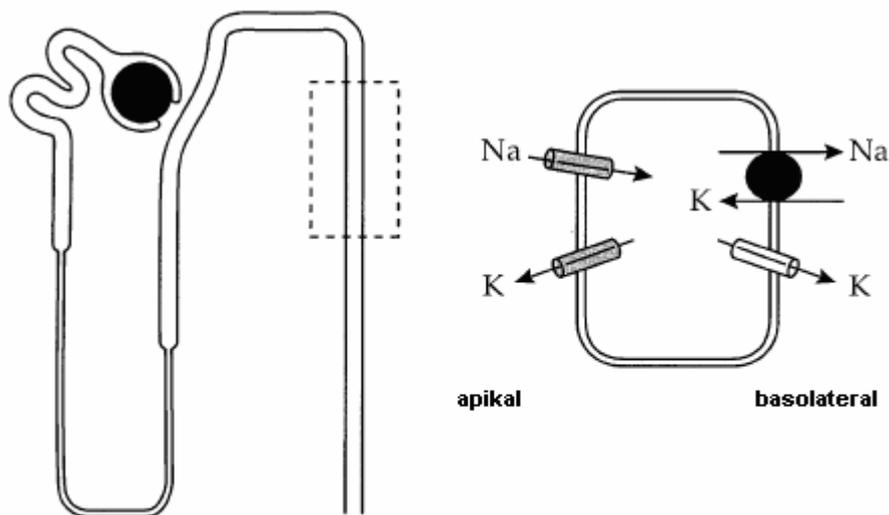


Abbildung 2: Modell einer Hauptzelle des kortikalen Sammelrohrs

1.3 Der ATP-abhängige Kaliumkanal ROMK

ROMK ist ein einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal, der hauptsächlich in der Niere, aber auch in Gehirn, Lunge und Auge exprimiert wird. Man findet diesen in der apikalen Membran des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr. Als Hauptaufgaben sind die Rezirkulation von Kalium im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife und der Kaliumsekretion im kortikalen Sammelrohr zu nennen [9, 14]. Der ROMK-Kanal weist bei bestimmten Formen des sog. Bartter-Syndroms, einer familiären, durch Salzverlust geprägten Nierenerkrankung, Mutationen auf. Durch weiteren Aufschluss über die Funktionsmechanismen des Kaliumkanals ROMK könnten möglicherweise neue Therapieansätze zur Behandlung des Bartter Syndroms gefunden werden.

1.3.1 ROMK- Struktur und Aufbau

Der einwärts-gleichrichtende, ATP-regulierte K^+ -Kanal ROMK1 (K_{IR} 1.1) [9, 14, 15] wurde aus dem äußeren Mark der Rattenniere kloniert. ROMK bildet zusammen mit anderen, später entdeckten Kaliumkanalgenen, die Klasse von einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanälen der K_{IR} -Familie [15-17]. Das ROMK1-Kanalprotein besteht aus intrazellulären N- und COOH-Termini und zwei Transmembranhelices (M1 und M2), die durch eine „H5“-ähnliche Region verbunden sind. Dieser Abschnitt bildet einen Teil der Kanalpore (siehe Abb. 3) [14, 18].

Der COOH-terminale Teil von ROMK ist für mögliche Protein-Protein-Interaktionen von großem Interesse. Er enthält eine Aminosäuresequenz (Thr/Glu/Met), die eine hohe Ähnlichkeit zu PDZ-Interaktionsmotiven aufweist. PDZ-Motive wurden ursprünglich als sich wiederholende, homologe Regionen zwischen dem Produkt des *Drosophila* dlg-Tumor Suppressor Gens und dem synaptischen Protein PSD-95 (auch bekannt als SAP90) identifiziert [19]. Seitdem wurden in mehr als 50 verschiedenen

Proteinen mehrere Arten dieses aus 80-90 Aminosäuren bestehenden Motivs gefunden. Es macht den Anschein, dass jedes PDZ-Protein auf eine spezifische subzelluläre Domäne beschränkt ist. Zu diesen Domänen gehören u. a. die Synapsen, Zell-Zell-Kontakte sowie die apikale und basolaterale Zellmembran von Epithelien. Dies führte zur Annahme, dass PDZ-Domänen eine zentrale Rolle in der Organisation von Plasmamembrandomänen einnehmen [20]. PDZ-Domänen können zum einen an spezifische Sequenzen am Carboxyl-Terminus von Proteinen binden, zum anderen aber auch mit anderen PDZ-Domänen Dimere bilden [21]. Neben der Organisation von Transmembranproteinen scheinen PDZ-Domänen [22] auch beim gerichtetem Transport von Signalproteinen zur Plasmamembran beteiligt zu sein [23].

Vor diesem Hintergrund scheint es möglich, dass der COOH-terminale Teil von ROMK, der eine hohe Homologie mit einem PDZ-Interaktionsmotiv aufweist, auch mit anderen PDZ-Domänen tragenden Proteinen interagieren könnte. Diese Möglichkeit proteinbiochemisch zu überprüfen, war eine der Zielsetzungen meiner Arbeit.

1.3.2 Kanalisformen und Lokalisation

Die ROMK-Isoformen werden an unterschiedlichen Orten entlang des Nephrons exprimiert [24]. ROMK2 ist der Kanal mit dem kürzesten NH₂-Terminus. Er ist am meisten verbreitet. ROMK1 ist besonders im Sammelrohr zu finden. ROMK3 ist dagegen überwiegend in distalen Nephronsegmenten, wie dem dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife nachweisbar [15]. Die Verteilung der ROMK-Kanalisformen lässt vermuten, dass ROMK-Proteine den „kleinen“ sekretorischen Kaliumkanal im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife und der Hauptzellen des Sammelrohrs bilden.

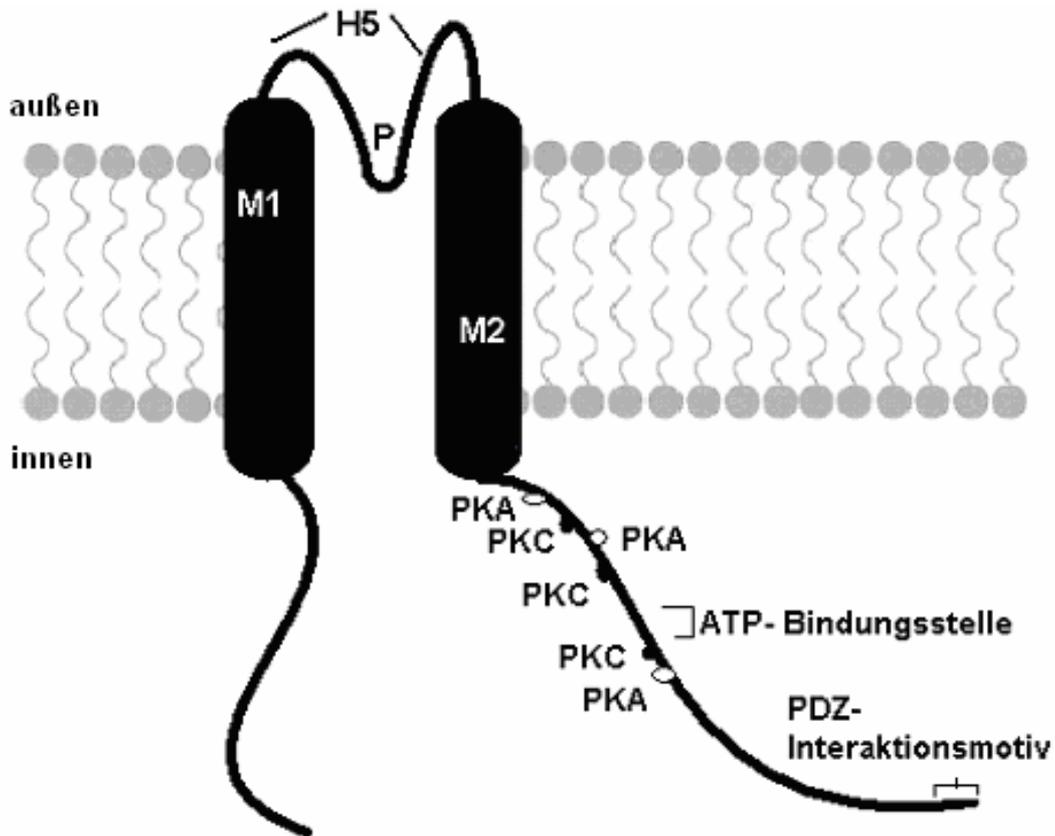


Abbildung 3: Modell von ROMK1 Kanalprotein.

Das die Kanalpore formende P-Segment liegt zwischen den Transmembrandomänen. Ein ATP-bindender Segmentabschnitt liegt in der Nähe mehrerer potentieller Phosphorylationsstellen und scheint in die Regulation des Kanals involviert zu sein. Glykosilierungsstellen und mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) sind ebenso dargestellt. Das vermutete PDZ- Interaktionsmotiv am COOH- terminalen Ende ist markiert.

1.3.3 Die Regulation von ROMK

ROMK-Kanäle haben viele Gemeinsamkeiten mit den „kleinen“ sekretorischen Kaliumkanälen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife und des kortikalen Sammelrohrs. Zu nennen sind u.a. die Einzelkanalleitfähigkeit, die schwache

von Magnesium abhängige Einwärtsgleichrichtung, die Kationenselektivität und die pharmakologischen Eigenschaften. Er wird durch den intrazellulären pH-Wert reguliert und durch Arachidonsäure gehemmt. Die Phosphorylierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) ist dabei zwingend für seine Aktivierung erforderlich und induziert verschiedene Modifikationen in der Kinetik der ROMK2-Aktivität [25, 26].

1.3.4 Mögliche Interaktionspartner von ROMK- Kanälen

Alle ROMK-Kanäle haben drei Serinreste, die durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden können [14]. Um eine Verbindung des zytosolischen Proteins PKA mit dem membranständigen ROMK zu erreichen, wird die Gegenwart des „A kinase anchoring protein“ (AKAP) benötigt, welches eine Bindungsstelle für die Regulationsuntereinheit von PKA und zwei Domänen für die Verankerung mit dem Zytoskelett besitzt [26]. AKAP's spielen somit eine wichtige Rolle für die Kontrolle der PKA-vermittelten Phosphorylierung von ROMK.

Seit der Klonierung des Cystic fibrosis transmembrane conductance regulators (CFTR) wurde von mehreren Gruppen untersucht, ob CFTR gekoppelt an ROMK-Kanäle in der Niere funktionstüchtige ATP-sensitive K^+ -Kanäle formt. CFTR ist ein Mitglied der ATP-binding-casette-transport Familie [27]. Die Ko-Expression von CFTR und ROMK2 ließ bei Gabe eines Sulfonyl-Harnstoff-Derivats eine Hemmung der ROMK2-Aktivität sichtbar werden [28]. Untersuchungen zur ATP-Regulation von ROMK1 zeigten, dass bei der Ko-Expression von CFTR und ROMK1 die ATP-Sensibilität des Kaliumkanals annähernd den Werten von nativem Gewebe gleichkommt. Dies deutet darauf hin, dass CFTR für einen Anstieg der ATP-Sensibilität notwendig sein kann [29].

Die Gabe von 5 mmol/l Mg-ATP führt zu einem reversiblen Aktivitätsverlust von ROMK2-Kanälen in isolierten Membranflecken. Sensibilität gegenüber Sulfonyl-

Harnstoff-Derivaten (z.B. Glibenclamid) konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden [28].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ROMK erst unter der Ausbildung eines Netzwerks mit anderen Proteinen seine Funktion erhält und/oder seine Lokalisation erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Anhaltspunkte für eine mögliche Interaktion von ROMK mit anderen Proteinen weiter untersucht werden.

1.4 Vorarbeiten

Das „Hefe-Zwei-Hybrid“-System, welches von Fields und Song entwickelt wurde, stellt eine Methode dar, um zwei Proteine *in vivo* auf mögliche Interaktion hin zu testen. Marcel Philipp Roos nutzte diese Technik, um mögliche Interaktionspartner des Kaliumkanals ROMK zu identifizieren.

Es konnten bei diesen Experimente 174 mögliche Interaktionspartner des zytoplasmatischen Schwanzes von ROMK ausgemacht werden. Es wurden nach folgenden Kriterien elf Proteine für weitergehende Experimente ausgewählt: Die entsprechenden Proteine (siehe Tabelle) sind entweder an der Organisation des Aktin-Zytoskelettes beteiligt sind, tragen eine PDZ-Domäne oder sie sind bekannte Partner für Protein-Protein Interaktionen.

PROTEINNAME	DIE AUFGABE DES PROTEINS
Acidic Calponin	<ul style="list-style-type: none"> – F-Aktin-, Aktin-Tropomyosin- und Ca²⁺-Calmodulin-bindendes Protein – Inhibiert <i>in vitro</i> die Aktomyosin-MgATPase
Antiquitin	<ul style="list-style-type: none"> – Involviert in die Regulation des Turgor
ArgBP2 (ArgAb12)	<ul style="list-style-type: none"> – Mögliches Adapterprotein für die komplexe Signalzusammensetzung in „Stressfasern“ – Potentielles Bindeglied zwischen den Kinasen der Abl-Familie und dem Aktin-Zytoskelett

Calponin 2	<ul style="list-style-type: none"> – Interaktionsregulator zwischen Aktomyosinfilamenten in glatten Muskelzellen – Beteiligt an der Regulation des Zytoskeletts in „nicht-muskulären“ Zellen und der Kontrolle des Neuritenwachstums
Dia 2	<ul style="list-style-type: none"> – Notwendig für Zytokinasen, die Formation von „Sressfasern“ und die Aktivierung des „serum response factor (SRF) durch Transkription
HEF1	<ul style="list-style-type: none"> – Definiert eine Familie von „multidomain docking“ Proteinen – Zentrale Rolle für die Zelladhäsion durch Tyrosinkinase-vermittelte Singale
KvLQT1	<ul style="list-style-type: none"> – Spannungsgesteuerter Kaliumkanal – Interagiert mit der kleinen Untereinheit KCNE1 und bildet einen für die Repolarisation der Herzmuskelzellen wichtigen K⁺-Kanal
NHERF2	<ul style="list-style-type: none"> – „Na⁺/H⁺-exchange regulatory factor“ – PDZ-ähnliches Protein – Trägt zwei PDZ-Domänen
NUMB2	<ul style="list-style-type: none"> – Involviert in Protein-Protein-Interaktionen – Ähnelt einem Adapter- oder Gerüst-Protein – Involviert in den Zusammenschluss verschiedener Proteine zu funktionellen Einheiten oder „Bahnen“
POSH	<ul style="list-style-type: none"> – Trägt eine SH3 Domäne – Involviert in den JNK und NF-kappa Signalweg
Shank3a	<ul style="list-style-type: none"> – Gerüstprotein im PSD – Involviert in die Regulation des Aktin Zytoskeletts durch Proteinkomplexbildung

Tabelle 1: Ergebnis des Hefe-zwei-Hybrid Systems: Ausgewählte Proteine – Aufbau und Funktion

Diese Proteine könnten nämlich durch eine Interaktion mögliche Anhaltspunkte für die Funktionsmodulation und/oder die Lokalisation von ROMK geben. Die Interaktionen

dieser Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter charakterisiert. Dies geschieht einerseits *in vitro* durch eine Affinitätspurifikation von GST- bzw. HIS-Fusionsproteinen mit den möglichen Interaktionspartnern. Andererseits kann die Immunfluoreszenz durch die Darstellung von Proteinen und die Untersuchung ihrer räumlichen Lage in den Zellen und zu anderen Proteinen einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Interaktion geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1.1 Chemikalien

- (Car)-Ampicillin, Sigma C₁₇H₁₆O₆penicillin
- 10x PCR Puffer, Boehringer Ingelheim
- 1M Phosphorsäure, Sigma
- 3 Amino-1,2,4-Triazol, Sigma C₂H₄N₄
- Acrylamid, American Bioanalytical
- Agar, Difco
- Agarose, American Bioanalytical
- Ammoniumchlorid, J. T. Baker NH₄Cl
- Aprotinin, Sigma
- Aquamount, Lerner Laboratories
- Äthidiumbromid, Gibco BRL
- Bovines-Serum-Albumin, Sigma
- Bromphenol Blau, Sigma
- 100x Purifizierter BSA-Puffer, New England Biolabs
- Coomassie Blau, Biorad
- DMF, Dimethylformamid American Bioanalytical
- DMSO, Dimethyl-Sulfoxid (CH₃), 2SO
- dNTP-Mix- Desoxynucleoside Triphosphat Set, Boehringer Ingelheim dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- DTT, Sigma

- EDTA, Disodium Salt, Dyhydride, Crystal $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$,
- Ethanol, J. T. Baker
- Essigsäure, J. T. Baker
- Glutathion Sepharose Beads 4I, Amersham Pharmacia Biotech. AB
- Glycerol, J.T Baker
- Glycin, J. T. Baker
- Guanidinde-HCl, Intendon Biotechnologies, Inc. New Haven, Kodak CH_5N_3-HCl
- Harnstoff, J.T- Baker NH_2CONH_2
- HCl, J. T. Baker
- Hefe-Extrakt, Difco
- Hepes, American Bioanalytical $C_8H_{18}N_2O_4S$
- Imidazole, Sigma
- Isopropyl β -D-Thiogalaktosid (IPTG), American Bioanalytical
- Isopropanol, J. T. Baker $CH_3-CH-OH-CH_3$
- Kaliumacetat, American Bioanalytical
- Kaliumdiphosphat, J. T. Baker
- Kaliumphosphat, J. T. Baker KH_2PO_4
- KCl, J. T. Baker
- Magnesiumsulfat, Sigma $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- Mercaptoethanol, American Bioanalytical C_2H_6OS
- Methanol, J. T. Baker CH_3COOH
- [^{35}S] Methionin (1000Ci/mmol bei 10mCi/ml), Yale University
- $MgCl_2$, J. T.Baker
- NaCl, J.T Baker
- NaOH, J. T. Baker
- Natriumhydrogenphosphat, J. T.Baker $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- NEB Puffer 1,2,3 und 4, New England Biolabs
- Ni-NTA Beads, Qiagen
- α -MEM I Reduced Serum Medium ohne Serum, Gibco

- 16 % Paraformaldehyd, Electron Microscopy Sciences
- Pepstatin A, Sigma $C_{34}H_{63}N_5O_9$
- Restriktionsenzyme, New England Biolabs
- RnaseA, Sigma
- Sarkosyl, Sigma
- SDS, American Bioanalytical
- TEMED, American Bioanalytical
- Thiamine HCl, Gibco BRL
- TRIS base, American Bioanalytical
- TRIS, American Bioanalytical (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)
- Tris-HCl, American Bioanalytical $C_4H_{11}NO_3 \cdot xHCl$
- Triton-x-100, Acros Organs $C_{34}H_{62}O_{11}$
- Trypsin, J. T. Baker
- Tryptone Peptone, Difco
- Tween20, American Bioanalytical Polyoxyethelene Sorbitone
- Xylenxanol F, American Bioanalytical

2.1.1.2 Lösungen und Puffer

- 5 x DNA Probenpuffer

80%	Glycerol
100mM	EDTA
0,025%	Bromphenol Blau
0,025%	Xylenxanol F

- 10 x Laufpuffer

25mM	TRIS base
------	-----------

150mM Glycin
0,02% SDS

- 10 x TAE (Tris/Acetat/EDTA) Elektrophorese-Puffer

242g TRIS base
57,1ml Essigsäure
100ml 0,5 M EDTA (pH8,0)
zu 1 l mit dH₂O auffüllen

- Bead Binding Puffer

50mM Kaliumphosphat, pH 7.5
150mM KCl
1mM MgCl₂
10% (v/v) Glycerol
1% (v/v) Triton X-100

- DTT (Dithiothreitol), 1M

Löse 1.55 g DTT in 10 ml sterilem Wasser. Bewahre Aliquots bei -20°C auf

- Ladebuffer für SDS-Gele (2x) nach Laemmli

1,0ml 1M DTT
3,5ml 20% SDS

1,0ml	0,1 % Bromphenol Blau
1,0ml	3 M TRIS pH 8,9 (Puffer A)
2,0ml	Glycerol
1,5ml	H ₂ O

- Ni-Interaktionspuffer

50mM	NaH ₂ PO ₄
300mM	NaCl
10mM	Imidazole
20mM	KCl
2mM	MgCl ₂

- Ni-Waschpuffer

50mM	NaH ₂ PO ₄
300mM	NaCl
40mM	Imidazole
20mM	KCl
2mM	MgCl ₂

- Permeabilisationspuffer für Immunfluoreszenz

0,3%	Triton-x-100
0,1%	BSA
in PBS gelöst	

- PBS (phosphate-buffered saline)

137mM NaCl
 2,7mM KCl
 4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 1,4mM KH_2PO_4
 pH 7,4

- Protease-Inhibitor Cocktail

Protease-Inhibitoren		Für 688 μl	Inhibition von
Pepstatin A	0,1mg/ml	66 μl von einer 1mg/ml Stammlösung (in DMSO)	Carboxylproteasen
Leupeptin	0,03 mM	2 μl von einer 10,5mM Stammlösung	Einige Thiol- und Serineproteasen
Benzamidine	145 mM	500 μl von einer 200mM Stammlösung	Trypsin, Plasmin, und Thrombin
Aprotinin	0,37mg/ml	120 μl von einer 2,1mg/ml Stammlösung	Einige Serineproteasen

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.2.1 Geräte

Autoklaven, Stiefenhofer

Blotgerät, Hoefer

Brutschrank, Heraeus

Digitales pH/Millivolt-Meter 611, Orion Research
Einmal Reagenzgläser, Glass, 130x100mm, MIMAX51, VWR
Elektroporator (Micropulser), Bio Rad
Entwickler, Kodak
Erlenmeyerkolben, 250, 500, 1000 ,2000ml, Pyrex
Flaschen, 100 ,250, 500, 1000ml, Pyrex
Gefriertruhe (-20), Revco
Gelkammern, Höfer/Stratagene
Geltrockner, H. Hölzel GmbH
Inkubatoren für Eppendorf-Reaktionsgefäße, Liebisch
Fotokopierer, Sony
Kühlschrank, VWR-Scientific
Messzylinder, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000ml, Nalgene
Meßkolben, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000ml, KIMAX
Mikroskop, Leica
Misch- und Heizblock, VWR-Scientific
Mikrowelle, Panasonic
Präzision Standard Waage, Ohaus
Rotoren, Beckman
 - GSA, Beckman
 - SS34, Beckman
Quick Shooter(Gele), Model QSP, International Biotechnologies Inc. (New Haven)
Schüttelndes Wasserbad, Scientific, JNc. Precision
Schüttler, Environ Shaker, Lab Line ORBIT
Sonicator, Stratagene
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments: Rotor GSA
und SS34
Spektrometer, Lambda 3B UV/VIS, Perkin Elmer
Spannungsgeräte, Biorad Modell 200/2.0
Sterilbank, Flow Laboratories

UV-Lampe, Bachofer
Vortexer 2, VWR-Scientific
Waage AJ100, Mettler
Wasserbad, Hartenstein
Wippe, Reliable Scientific
Zentrifugen, Eppendorf/ Beckman

2.1.2.2 Verbrauchsmaterial

Deckglas, Sigma
Foto Prep, Fotodyne
Haushaltsfolie
Kimwipe-EX-L, Kimberley Clark
Latexhandschuhe Evolution One, Microflex
3 MM-Papier, Whatman
Parafilm (Laboratory Film), Sigma
Pasteur Pipetten, Eppendorf
Pipettenspitzen 1-10 l, 1-100 l, 1-1000 l, USA Scientific
WB Film Hyperfilm, Amersham Pharmaceutical Biotech
Zahnstocher, Lady Dianne

2.1.3 Molekularbiologie

2.1.3.1 Medien

LB-Medium für Bakterien (für 1l):

10 g Trypton Pepton

5 g Hefe Extrakt

10 g NaCl

mit H₂O zu einem Liter auffüllen und autoklavieren.

Auf 55°C abkühlen lassen und 1ml einer 50mg/ml Ampicillin-Stammlösung hinzugeben.

2.1.3.2 Bakterienstämme

Escherichia coli Stämme:

Subcloning Efficiency DH5 α , Gibco, Life Technologies

KC8, Clontech

BL21-Gold (DE3), Stratagene

2.1.3.3 Vektoren

EFmEGFP, Invitrogen

pBluescript, Stratagene

pBluescript KS-, Stratagene

pcDNA3.1+ -HA, Invitrogen (mit selbst eingefügtem HA- Tag)

pcDNA3.1 (+/-), Invitrogen

pcDNA3.1-HIS C, Invitrogen

pCMV- Flag- 6c, Sigma

pEBFP-N1, Clontech Laboratories, Inc.

pGEX4T3, Amersham Pharmacia Biotech

pJ3(Ω), Jay P. Morgenstern, Hartmut Land, Imperial Cancer Research Fund, UK

pRK5 MYC, British Biotech

pT7T3d-Pac, M.B. Soares

2.1.3.4 Enzyme

Restriktionsenzyme

BamHI	- New England Biolabs
EcoRI	- New England Biolabs
EcoRV	- New England Biolabs
HindIII	- New England Biolabs
NheI	- New England Biolabs
NotI	- New England Biolabs
XhoI	- New England Biolabs

Ligationsenzyme

T4Ligase	- New England Biolabs
----------	-----------------------

PCR Enzyme

Pfu Polymerase	- Boehringer Ingelheim
Taq Polymerase	- Boehringer Ingelheim

2.1.3.5 Größenmarker

DNA-Größenmarker

1 kb-DNA ladder, Bio Rad

123bp-DNA ladder, Bio Rad

Protein-Größenmarker

- Molecular Weight Standards High range, Bio Rad Protein Assay, Bio Rad
- Molecular Weight Standards Low range, Bio Rad Protein Assay, Bio Rad

2.1.3.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der HHMI/Keck Oligonucleotide Sythesis Facility der Yale Universität bezogen.

Sequenzier-Primer (mit „Annealing“ Temperatur)

CMVPRIM	GAT AGC GGT TTG ACT CAC G	51°C
DIA2 3PR	ATC AAG GCA GTT GAG AAG G	49°C
DIA2 5PR	TGC AAC TTG GGT CGC TTC T	51°C
HARPRIM	AGC GTA ATC TGG TAC GTC G	51°C
M13REV	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	48°C
NUMB25PRI	CTG CCA CTG ATG TGG ACG	53°C
PCDNA3.1R	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	50°C
PEBFP-1	CGG TGA ACA GCT CCT CGC	55°C
PFLAG3	CAA TTA TCT ATC GAT GGT ACC G	51°C

PFLAG5	GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC	52°C
ROMK M53	GCG TAT GTT CAT AAG GAC CT	50°C
SHANK3 3P	GCT CCA GTC CTG AGG CCT	55°C
SHANK3 5P	GG AGA AGA CTA CCA CAC A	48°C
SHANK3STA	GCT GTG TAG CTG GAC ATA GTC	54°C
SHANK3STO	GAT GAG ATC CTG GCA GTT G	51°C
T 7 S	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	48°C

PCR-Primer (mit Hybridisierungstemperatur)

FRAME1_	TAC ATG CTG CAT GGT CTA ATG CGA CGA TC	61°C
FRAME1_S	CTAG ATG TAC GAC GTA CCA GAT TAC GCT G	62°C
FRAME2_A	TAC ATG CTG CAT GGT CTA ATG CGA CCGATC	63°C
FRAME2_S	CTAG ATG TAC GAC GTA CCA GAT TAC GCT GG	63°C
FRAME3_A	TAC ATG CTG CAT GGT CTA ATG CGA CACGATC	63°C
FRAME3_S	CTAG ATG TAC GAC GTA CCA GAT TAC GCT GTG	63°C
GSTROMK3	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	62°C
GSTROMK5	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	62°C
ROMK2S2	G GAA TTC ACG TTC AGC AAG AAT GCG	58°C
ROMKFLAG3	CAG AGC GAT ATC CTA CAT CTG GGT GTC GTC C	66°C
ROMKFLAG5	GG GAA TTC ATG TTC AAA CAC CTC CGA	58°C
STOP_A	CCG GGA CTC ACT CAC T	49°C
STOP_S	CTG AGT GAG TGA GGC C	49°C

2.1.3.7 Antikörper

Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes

Anti-Mouse IgG (whole molecule)	Peroxidase-Konjugat, Sigma
Anti-ROMK1	Polyklonaler Kaninchenantikörper, Alomone Labs
Anti-6-HIS	Polyklonaler Kaninchenantikörper, Berkeley Antibody Company
Anti-HA.11	Monoklonaler Mausantikörper, Berkeley Antibody Company
Anti-c-MYC 9E10	Monoklonaler Mausantikörper, Sigma
Anti-Xpress	Monoklonaler Mausantikörper, Invitrogen

2.1.3.8 KIT-Systeme

mMESSAGE mMachine, Ambion
QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kit, Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen
TNT Quick Coupled Transcription/Translation System, Invitrogen

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Nährmedien

ALPHA-MEM I Reduced Serum Medium ohne Serum, Gibco BRL
Komplettmedium, Gibco BRL (mit 20% FKS)

2.1.4.2 Zellstämme

COS WT Zellen

2.1.4.3 Transfektion

LipofectAMINE 2000 Reagent, Gibco BRL, Life Technologies

PerFect Lipids, Invitrogen

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit DNA

Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit DNA für 15 min auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock (1 min bei 37°C) für 1 h in 1 ml LB-Medium bei 37°C ohne Antibiotikum vorkultiviert. Zur Anzucht der Bakterienkolonien wurden Bakteriensuspensionen auf LB-Platten (1 l LB-Medium, 15 g/l Agar) ausgestrichen, die zur Selektion plasmidtragender Bakterien mit 25 µg/ml Ampicilin versetzt waren, und für ca. 18 h bei 37°C bebrütet.

Plasmidisolation

Miniprep

Der Miniprep dient zur schnellen Herstellung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen, die erfolgreich mit DNA transformiert worden waren. Entsprechend den Herstellerangaben erfolgt der Miniprep aus 5 ml Bakterienkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen.

Maxiprep

Die präparative Isolation hochgereinigter DNA, die auch für Transfektionsexperimente und Sequenzierung geeignet ist, erfolgte nach Angaben des Herstellers, mit dem QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit, Qiagen, aus 500 ml Bakterienkultur.

Agarose-Gel

Sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von DNA wurde die Gelelektrophorese mit TAE-Puffer eingesetzt. Für ungespaltene Plasmide wurden 0,8%ige Agarosegele eingesetzt, während für PCR-Produkte und Restriktionsanalysen 1,0%ige bzw. 1,2%ige Gele zum Einsatz kamen. Die mit TAE-Ladepuffer versetzten Nukleinsäuren wurden in Geltaschen pipetiert. Anschließend wurden die Proben im elektrischen Feld durch eine angelegte Spannung von 80-120 V aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Banden im UV-Licht war das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid im Gel enthalten. Durch den Vergleich mit einem DNA-Standard (Größenmarker) konnten die DNA-Fragmentgrößen bestimmt werden.

DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Bei analytischen Ansätzen wurden 1 – 5 µg DNA mit Restriktionsendonukleasen und dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit Wasser in Reaktionsgefäßen auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 90 min – 18h bei 37°C wurden die entstandenen DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese aufgetrennt und das Bandenmuster analysiert. Zur Präparation von DNA-Fragmenten oder Vorbereitung von Plasmidvektoren standen bis zu 15 µl DNA zur Verfügung, was ca. 1,5 µg DNA entspricht. Diese wurden bei 37°C über Nacht geschnitten und ebenfalls im Gel aufgetrennt.

Gel-Extraktion

Für die Klonierung wurde das gewünschte DNA-Fragment im UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA nach Herstellerangaben mit dem QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, aus dem Gelstück eluiert und im Agarosegel auf Reinheit überprüft.

DNA-Ligation

Für die Gewinnung eines zu klonierenden DNA-Fragments aus einem Plasmid wurde eine präparative DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen durchgeführt und das Fragment aufgereinigt. Das als Rezipient dienende Plasmid wurde mit dem gleichen Restriktionsenzym wie das Insert linearisiert. Mittels der T4-Ligase und dem dazugehörigen Puffer wurden das Fragment und der Vektor über Nacht bei 16°C ligiert und anschließend in kompetente E. coli transformiert.

2.2.2 PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion kann eine große Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA Sequenz hergestellt werden.

Hierzu wurde ein Reaktionsgemisch aus 0,1 – 10 ng DNA-Matrize, 5µl 10x PCR Puffer, 10 mmol/l 4 dNTP Mix, 2,5 U DNA Polymerase, 50µmol/l jedes der beiden Primers angesetzt. Mit Wasser wurde das Gemisch zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 29 PCR-Zyklen (2 Minuten Denaturierung bei 95°C, 40 Sekunden Annealing (Primerbindung) bei 49 – 66°C, Extension (Elongation) bei 72°C) und einer abschließenden Strangauffüllung (5 Minuten bei 72°C), unterworfen.

Die Annealingtemperatur sollte nach vorangegangener Berechnung in Anlehnung an die Schmelztemperatur der Primer zwischen 49°C und 66°C liegen. Dabei war zu beachten, dass die Differenz der Schmelztemperaturen der beiden Primer 5°C nicht überschreitet.

Die Extensionszeit richtete sich nach Art der Polymerase und Länge des PCR Produktes. Die Taq Polymerase arbeitet bei ~ 1000 bp/min, die Pfu Polymerase bei ~ 500 bp/min

Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Mit dieser Methode ist lediglich eine qualitative Aussage über die Größe möglich.

Purifikation von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von DNA aus Restriktionsverdau und PCR-Prozessen wurde der QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

Auftrennung von Proteinen über Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine schnelle Methode, um Proteine zu quantifizieren, zu vergleichen und zu charakterisieren. Vorwiegend werden dabei Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS bindet an die Polypeptidketten, wodurch Polyanionen entstehen. Das Laufverhalten des reduzierten Protein-Komplexes ist dann proportional zu seinem Molekulargewicht.

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen wurden zwei Glasplatten mit 1% SDS, anschließend mit Wasser und dreimal mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Die ebenfalls gereinigten Spacer wurden zwischen die Glasplatten mit Photoklammern geklemmt. Zum Abdichten fand Agarose (2%) Verwendung.

In einem Kolben wurde für das Trenngel (10%) Acrylamid, SDS (0,1%) und H₂O gemischt. Nach Zugabe von Temed wurde vorsichtig geschüttelt und das Gemisch zwischen die Glasplatten gegossen, bis etwa 2cm unterhalb des später einzusetzenden Kammes. das Gel wurde mit Laemmli-Puffer überschichtet und für 30 Minuten bis zur Polymerisation stehengelassen. Durch den Puffer wird verhindert, dass die obersten Schichten in Kontakt mit der Luft geraten, komplett polymerisieren und so eine harte Grenze zum Sammelgel bilden. Der Laemmli-Puffer wurde entfernt, die Geloberfläche getrocknet und das nach gleicher Art wie das Trenngel vorbereitete Sammelgel (4%) auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Gel wurde ein Kamm gesteckt. Nach weiteren 30 Minuten war das Sammelgel polymerisiert.

Um später die Größen der aufgetrennten Proteine feststellen zu können, waren parallel ein Proteinstandard mit bekannter Proteingröße und bekannter Proteinmenge aufgetragen worden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 60 min bei einem Strom von 150 V.

Expression und Extraktion rekombinanter Proteine

Ein Fusionsprotein wurde folgendermaßen im E.coli Bakterienstamm BL21 exprimiert: Auf die Induzierung einer 1000ml Kultur mit 0,1 mM Isopropyl β -D-Thiogalaktosid (IPTG) folgte eine ca. 3 Stunden dauernde Kultivierungsphase. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 15 ml PBS resuspendiert, mit Protease-Inhibitoren versetzt und zu einem Endvolumen von 28.5 ml gebracht. Die Zellen wurden weiterhin mit einem Stabsonifizierer bei 40% Leistung für 5 mal 30 Sekunden sonifiziert. Nach Zugabe von 1,5 ml des 20 %igen Triton-X-100 (Endkonzentration 1%) konnte das Endvolumen von 30 ml für 30 bis 60 Minuten im Kühlraum unter ständiger Bewegung inkubiert werden. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 14000g wurde der Überstand in Aliquots bei -70°C gelagert.

In vitro-Transkription/Translation

Für die Proteinherstellung wurde das TNT Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega, nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hierzu wurden der TNT Quick Master Mix sowie die anderen Komponenten nach dem Entnehmen aus der -70 C -Kühltruhe auf Eis gestellt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 40 μl TNT Quick Master Mix, 2 μl [^{35}S] Methionin (1000Ci/mmol bei 10mCi/ml), 2 μl „DNA-Matrize“ DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie 6 μl nukleasefreies Wasser gemischt. Nach einer Inkubation von 60 – 90 Minuten bei 30°C konnte das Produkt durch eine SDS-PAGE Gelelektrophorese analysiert werden.

Affinitätspurifikation von GST- bzw. HIS-Fusionsprotein-bindenden Proteinen „(GST- bzw. HIS Pulldown)“

Die Affinitätspurifikation von GST- und HIS Fusionsproteinen ist eine Methode, um Protein-Protein Interaktionen *in vitro* nachzuweisen.

1 ml Fusionsprotein, 30 µl 50%ige Suspension der „Beads“, 10 µl [³⁵S] Methionin-markiertes *in vitro* Transkriptions-Translationsprodukt und 160 µl Bindungspuffer wurden als Mischung für 4 Stunden auf einem Rotor bei 4°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 14000g) folgte eine dreimalige Waschung der „Beads“ mit Bindungspuffer. Weiterhin wurden 15 µl 2x Laemmli-Ladepuffer hinzugegeben und die Reaktion für 5 Minuten gekocht. Der Überstand wurde durch eine SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und nach einem Fixier- und Waschschrift für 1 Stunde mit Autofluor inkubiert. Der abschließende Schritt war eine 2stündige Trocknungsphase des Gels im Vakuum des Gelrockners bei 80°C, bevor das Ergebnis nach 28-72stündiger Belichtungszeit durch die gekoppelte Radioaktivität auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte.

2.2.4 Zellkultur

Soweit nicht anders angegeben wurden die COS WT Zellen in Kompletmedium bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung im Zellinkubator kultiviert.

75 ml Zellkulturflaschen beherbergen adhärenente Zellen. Aufgrund der Adhärenz war bei jedem Umsetzen dieser Zelllinie eine Trypsinbehandlung zur Ablösung der Zellen erforderlich. Das Medium war zu verwerfen, die Zellen zur Entfernung von fetalem Kälberserum einmal mit PBS zu spülen und für 2 – 4 min in Trypsinlösung zu inkubieren. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch die Gabe von fetalem kälberserumhaltigen Medium. Die Resuspension der Zellen erfolgte mit Hilfe von 9 ml Medium. Die anschließende Kultivierung bis zur vollständigen Konfluenz dauerte 3 – 4 Tage, bevor eine erneute Umsetzung erfolgen konnte. Die Zellen wurden für die

Immunfluoreszenzversuche bis zur 90 – 100% Konfluenz in 6-Loch- bzw. 12-Lochplatten kultiviert.

Die transiente Transfektion wurde unter Verwendung der Reagenzien Lipofectamin 2000 und Perfect Lipid nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient zur Darstellung von Proteinen und der Untersuchung ihrer räumlicher Lage in Zellen und zu anderen Proteinen.

Transient transfizierte Zellen wurden in einem ersten Schritt mit 2% Paraformaldehyd fixiert und nach einigen Waschschritten mit PBS und einer Waschung mit Permeabilisationspuffer zusammen mit dem ersten Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Es folgte eine weitere Waschung mit Permeabilisationspuffer bevor sie mit dem zweiten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper für 45 Minuten inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellen mit Aquamount auf Objektträgern befestigt. Die Untersuchung der Immunfluoreszenz erfolgte sowohl mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop als auch mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Die Konstrukte wurden zur besseren Detektierbarkeit in verschiedene Vektoren mit unterschiedlichen Epitopen wie dem Hämagglutinin HA (Sequenz: YPYDVPDYA) des Influenza-Virus, dem humanen c-myc Gen (Sequenz: EQKLISEEDL), dem Poly-Histidin-modifizieren Protein (His6; Sequenz: HHHHHH) bzw. dem Express-tag kloniert. Diese Epitope ermöglichen es, Proteine zu markieren und sie durch spezifische gegen das Epitop gerichtete Antikörper mittels Immunfluoreszenz zu detektieren. Aufgrund ihrer geringen Größe ist es unwahrscheinlich, dass die Epitope die biochemischen und funktionellen Eigenschaften des markierten Proteins verändern. Die Tabelle im Abschnitt 3.1 (siehe S. 41) gibt einen Überblick über die verwendeten Vektoren und deren Besonderheiten.

3 Versuche und Ergebnisse

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben wurde der Kaliumkanal ROMK nach seiner Klonierung in Oozyten exprimiert. Studien über die Struktur und die Funktion ergaben eine Fülle an Informationen zu den biophysikalischen Vorgängen und der Regulation des Kanals. Es ist bisher aber nur wenig über diejenigen Prozesse bekannt, welche für seinen Transport zur apikalen Membran von Epithelzellen verantwortlich sind. Ein weiteres bisher ungelöstes Problem stellt der Mechanismus dar, welcher die Aktivierung des Kanals auslöst. „Ruhende“ Kanäle, die sich schon in der Membran befinden, oder neue Kanäle, die aus dem subapikalen Raum und durch Targeting und Einbauprozesse in die Membran gelangen, könnten dafür in Frage kommen. Proteine, die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen, dürfen als Auslöser des Kanal-Clusterings nicht aus dem Auge verloren werden.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollen die im Hefe-zwei-Hybrid System gefundenen Proteine mit weiteren molekulargenetischen Methoden im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit ROMK untersucht werden.

3.1 cDNA- Konstrukte für die Überprüfung von Protein-Protein Wechselwirkungen

Um die Interaktion der im Hefe-zwei-Hybrid System gefundenen Proteine weiter untersuchen zu können, wurden cDNA-Konstrukte der auf Seite 41 genannten Klone erzeugt. Dazu wurden verschiedenste Laboratorien angeschrieben und um Unterstützung gebeten. Aufgrund der unterschiedlichen Präferenzen der Arbeitsgruppen kamen die cDNAs der potentiellen Interaktionspartner in unterschiedlichen Vektoren. Teilweise war es nicht möglich, sie in andere Vektoren umzuklonieren. Somit kam eine

große Anzahl unterschiedlicher Vektoren zum Einsatz. Vor den Versuchen wurden alle Konstrukte, die von fremden Laboratorien stammten, durch Sequenzieren auf ihre Identität hin überprüft.

Calponin2 und Antiquitin konnten mit dem Hefe-zwei-Hybrid-System in voller Länge „gefischt“ werden. Für die weiteren Experimente wurden beide cDNAs mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI aus dem pACT2-Vektor geschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurden sie im korrekten Leserahmen in voller Länge in die EcoRI- (5′- Ende) und XhoI- (3′- Ende) Schnittstellen des Expressionsvektors pcDNA3.1+-HA subkloniert. Der genannte Vektor enthält einen T7-Promotor, der zum einen die *in vitro*-Transkription in „Sense“-Richtung und zum anderen ein leichtes Sequenzieren erlaubt. Desweiteren ist er mit einem HA-Tag versehen, was die Detektierbarkeit mit einem kommerziellen Anti-HA-Epitop Antikörper möglich macht.



Abbildung 4: Schema von Calponin2 im pcDNA3.1+ HA-Vektor



Abbildung 5: Schema von Antiquitin im pcDNA3.1+ HA-Vektor

Der Klon von Acidic Calponin wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, USA) bezogen. Die Klonierung erfolgte in die EcoRI- (5') und NotI- (3') Schnittstelle des pT7T3D-PAC Vektors. Letzterer enthält einen T7-Promotor und wurde nicht weiter verändert. Zum Sequenzieren diente der T7S-Primer.



Abbildung 6: Schema von Acidic Calponin im pT7T3D-PAC-Vektor

Das ArgBP2-Konstrukt wurde von Gary D. Kruh M.D., Ph.D. (Department of Medical Oncology, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) gestellt. Dieses Plasmid wurden in zwei verschiedenen Formen konstruiert. Eine cDNA wurde in den pBluescriptSK-Vektor, der einen T7-Promotor enthält, die andere, in den mit Myc-tag versehenen pJ3Ω-Vektor subkloniert. Zum Sequenzieren diente der T7S-Primer.

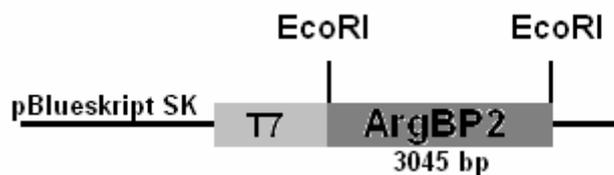


Abbildung 7: Schema von ArgBP2 im pBluescript SK-Vektor

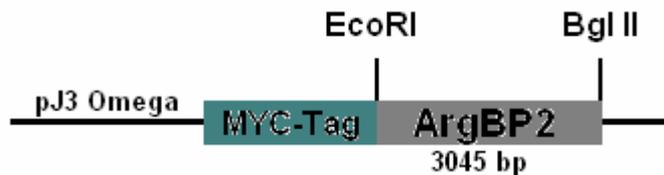


Abbildung 8: Schema von ArgBP2 im pJ3Ω-Vektor

Art Alberts Ph.D. (Van Andel Institute, Grand Rapids, USA) stellte das Dia2-Plasmid zur Verfügung. Es wurde in den Expressionsvektor EFmEGFP kloniert und enthält neben GFP ein Myc-Tag Epitop. Zum Sequenzieren dienten die Dia2 5P- und Dia2 3P-Primer. Trotz mehrerer Versuche gelang es nicht, das Insert in einen anderen Vektor subzuklonieren, um „GST Pulldown“ Experimente durchführen zu können.

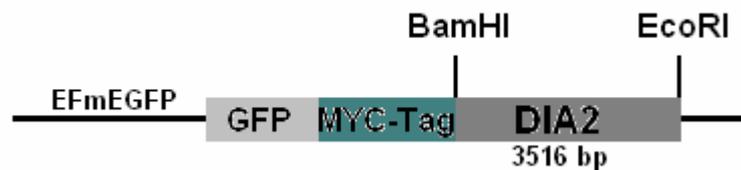


Abbildung 9: Schema von DIA2 im EFmEGFP-Vektor

Die cDNA von HEF1 ist in die EcoRI und XhoI Schnittstellen des Vektors pcDNA3.1+ ligiert. Dieses Konstrukt wurde von Geraldine O'Neill (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) gestellt. Zum Sequenzieren war der T7S-Primer im Einsatz.

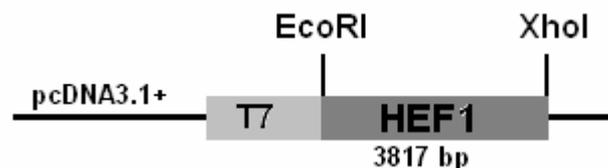


Abbildung 10: Schema von HEF1 im pcDNA3.1+-Vektor

NUMB2 wurde von Joe Verdi Ph.D. (Laboratory of Neural Cell Research, Robarts Research Institute, London, Canada) gestellt. Das Konstrukt wurde in den mit einem HA-Epitop versehenen pEGFP-N1 Vektor kloniert. Zum Sequenzieren kam der NUMB25PR-Primer zur Verwendung.



Abbildung 11: Schema von NUMB2 im pEGFP-N1-Vektor

POSH wurde in die Schnittstellen BamHI und HindIII des Expressionsvektors pRK5 MYC kloniert. Zur Durchführung der „GST-Pulldown“ Experimente war es nötig, POSH-cDNA in die BamHI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen des pcDNA3.1-Vektors umzuklonieren. Zum Sequenzieren wurde der T7S-Primer benutzt.

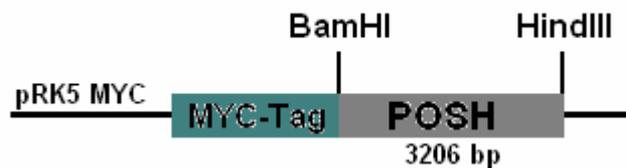


Abbildung 12: Schema von POSH im pRK5 MYC-Vektor

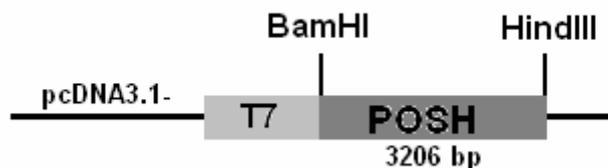


Abbildung 13: Schema von POSH im pcDNA3.1--Vektor

Die Shank-Isoformen Shank2 und Shank3 wurden von Morgan Sheng, MBBS, Ph.D. (Howard Hughes Medical Institute, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA) bereitgestellt. Shank2 wurde in den Vektor pcDNA3.1-, Shank3 in den Expressionsvektor pRK5 MYC subkloniert. Zum Sequenzieren dienten für

Shank2 der T7R-Primer und für Shank3 die SHANK3 3P-, SHANK3 5P-, SHANK3STA- und SHANK3STO-Primer.

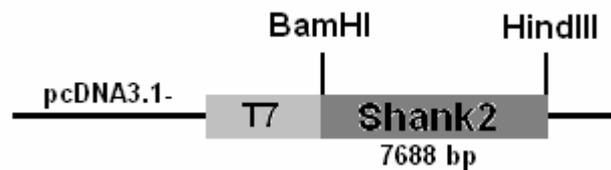


Abbildung 14: Schema von Shank2 im pcDNA3.1--Vektor

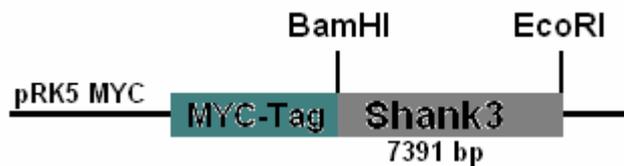


Abbildung 15: Schema von Shank3 im pRK5 MYC-Vektor

ROMK fand in verschiedenen Konstrukten Verwendung. Im Einsatz war zum einen eine native Variante von ROMK2, die in die Schnittstellen EcoRI und NotI des pcDNA3.1+-Vektors kloniert war. Diese konnte in den Immunfluoreszenzversuchen mit einem Anti-ROMK-Antikörper, der gegen das C-terminale Ende von ROMK (Aminosäuren 324-391) gerichtet ist, detektiert werden.

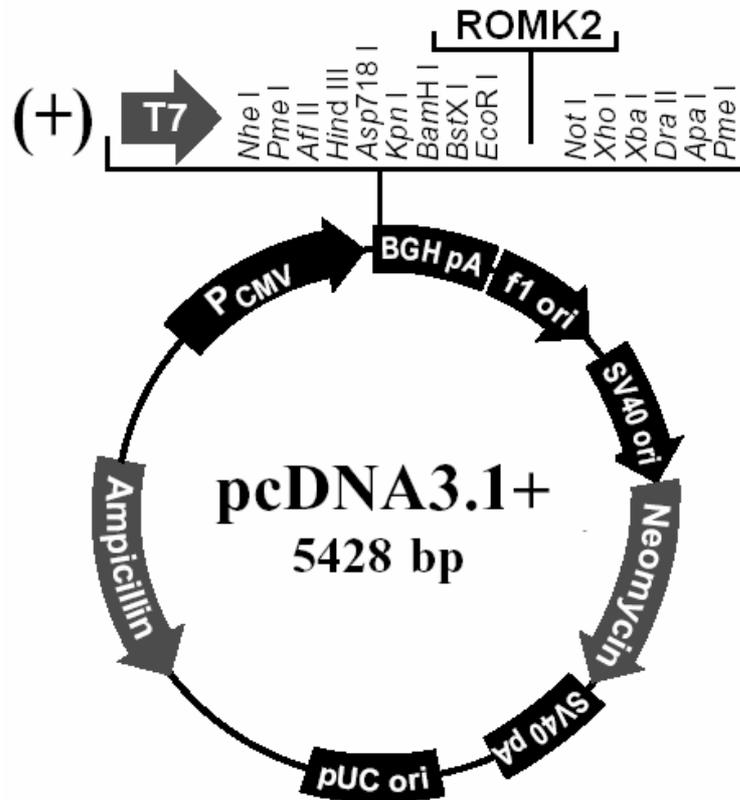


Abbildung 16: ROMK2 in den Schnittstellen EcoRI und NotI des pcDNA3.1+-Vektors

Zum anderen wurde eine mit einem Poly-HIS- und Xpress-Tag markierte Variante erstellt. Hierzu wurde der kodierende Teil der cDNA von ROMK2 in einer PCR mit den PCR-Primern ROMKFLAG5 und ROMKFLAG3 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit EcoRI und EcoRV in den pcDNA3.1 HIS C-Vektor inkloniert. Dieser Vektor enthält einen T7-Promotor, der sowohl die in vitro-Transkription in „Sense“-Richtung als auch ein leichtes Sequenzieren erlaubt. Der pcDNA3.1 HIS C-Vektor ist auch mit einem Xpress-Tag versehen, was die Detektierbarkeit mit einem kommerziellen Anti-Xpress-Epitop-Antikörper in der Immunfluoreszenz ermöglicht.

Des Weiteren enthält der Vektor eine Poly-HIS-Sequenz, welche die Aufreinigung des modifizierten ROMK2-Proteins erleichtert. Dieses Konstrukt von ROMK2 wurde in den „HIS- Pulldown“-Versuchen verwendet.

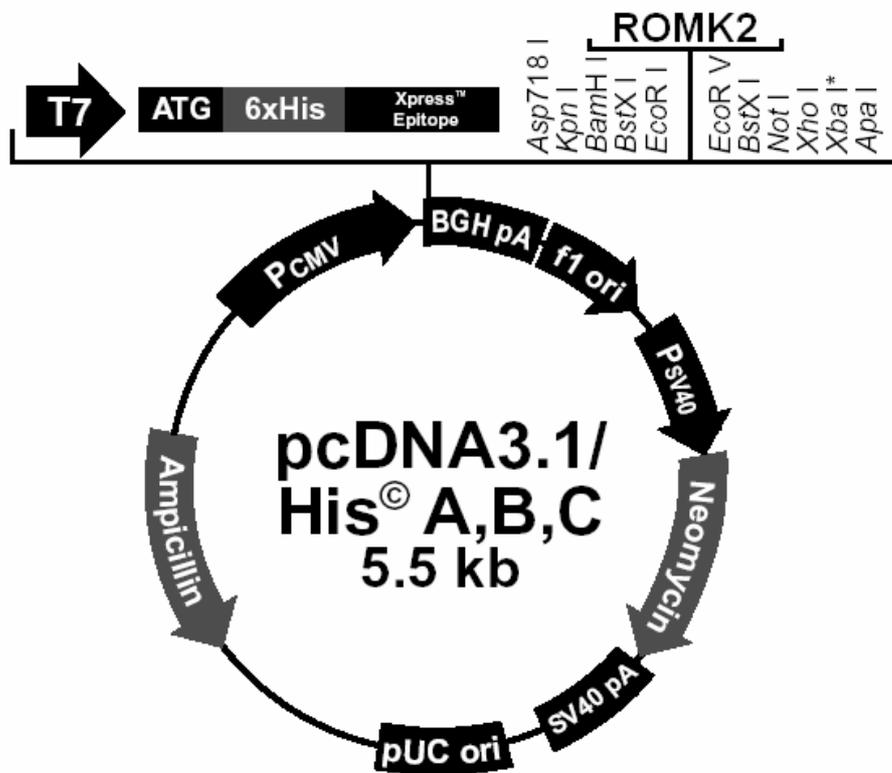


Abbildung 17:ROMK2 in den Schnittstellen EcoRI und EcoRV des pcDNA3.1 HIS C Vektors

Plasmid	Expressionsvektor	Klonierungsstellen 5'-Ende / 3'-Ende	Sequenzier- primer	Besonder- heiten
Calponin2	pcDNA3.1+-HA	EcoRI / Xho	T7S	HA-Tag T7-Promoter
Antiquitin	pcDNA3.1+-HA	EcoRI / Xho	T7S	HA-Tag T7-Promoter
Acidic Calponin	pT7T3D-PAC	EcoRI / NotI	T7S	T7-Promoter
ArgBP2	pBluescriptSK		T7S	T7-Promoter
ArgBP2	pJ3Ω			MYC-Tag
Dia2	EFmEGFP		Dia2 5P Dia2 3P	GFP-Tag MYC-Tag
pHEF1	pcDNA3.1+	EcoRI / XhoI	T7S	T7-Promoter
NUMB2	pEGFP-N1		NUMB25PR	HA-Tag
POSH	pRK5 MYC	BamHI / HindIII		
POSH	pcDNA3.1-	BamHI / HindIII	T7S	T7- Promoter
Shank 2	pcDNA3.1-		T7R	T7- Promoter
Shank3	pRK5 MYC		SHANK3 3P SHANK3 5P SHANK3- STA SHANK3- STO	

Tabelle 2: Übersichttafel der verwendeten Plasmide, deren Vektoren und ihrer Besonderheiten.

3.2 Der ROMK-GST-„Pull-Down“

Die Experimente stellen eine *in vitro*-Methode dar, mit der die im Hefe-System gefundenen Interaktionspartner des ROMK-Proteins weiter untersucht werden können.

3.2.1 Konstruktion des ROMK-GST Fusionsproteins

pGEX 4T3-ROMK enthält ein Konstrukt aus dem 3'-Ende der ROMK-cDNA (Basenpaare 675-1275) und der GST-cDNA. Das ROMK-Fragment, das dem intrazellulären C-Terminus des Kanalproteins entspricht, wurde mit den Primern GSTROMK5 und GSTROMK3 amplifiziert. Die Primer enthielten jeweils eine EcoRI- bzw. eine BamHI-Schnittstelle, so dass das ROMK-Amplifikat nach Restriktionsverdau in die entsprechenden Schnittstellen des pGEX4T3-Vektors inkloniert werden konnte. Es folgte die Transformation des ROMK-GST-Plasmids in den *E. coli* Stamm DH5 α . Nach einer Analyse der Restriktionsfragmente durch Restriktionsverdau und Auftrennung durch Gelelektrophorese wurde das Plasmid zum Sequenzieren zu Genewiz Inc. (New York, USA) geschickt. Das pGEX-ROMK-Fusionskonstrukt wurde daraufhin in den *E. coli* Bakterienstamm BL21 transformiert, da dies nach Herstellerangaben zu einer höheren Proteinexpression führt.



Abbildung 18: Schema von ROMK (Basenpaare 675-1275) im pGEX4T3-Vektor

3.2.2 Expression und Extraktion des Fusionsproteins

Das ROMK-GST Fusionsprotein wurde in Escherichia coli BL21 Zellen exprimiert. Bei 37°C folgte die Inkubation einer 1000 ml Kultur bis zu einer optischen Dichte (600nm) von 0.5-0.6. Nach einer 3-stündigen Induktion mit 0.1 mmol/l Isopropyl β -D-Thiogalaktosid (IPTG) bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation aufgereinigt. Die Resuspension der Zellen fand in 15 ml eiskaltem PBS, das mit Protease-Inhibitoren versehen worden war, statt. Das Produkt wurde mit PBS zu einem Endvolumen von 28.5 ml gebracht. Hierauf wurde die Lösung mit einem Stabsonifizierer bei 40% Leistung für 5 mal 30 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den Schritten, sonifiziert. Nach Zugabe von 1.5 ml des Detergenz Triton-X-100 wurde das Gesamtvolumen von 30 ml für 30 – 60 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Bevor der Überstand in 1 ml Aliquots auf -70°C gelagert werden konnte, musste er 30 min bei 4°C zentrifugiert werden. 20 μ l des Überstandes wurden zur Analyse der Proteinmenge mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. Hierbei konnte das ROMK-GST-Fusionsprotein allerdings nur in sehr geringen Mengen detektiert werden. Zur Verbesserung der Expressionsrate des Fusionsproteins wurde eine Zeitreihe mit verschiedenen Induktionslängen für IPTG (nach 30, 60, 90, 120 und 150 min) durchgeführt: Die 2-stündige Induktion zeigte die besten Ergebnisse. Doch selbst nach Verbesserung der Expression konnte das Fusionsprotein immer noch kaum im Überstand gefunden werden.

Zur genaueren Analyse der mangelhaften Proteinexpression wurden Proben bei verschiedenen Schritten der Proteinaufreinigung entnommen. Gesamtprotein vor dem letzten Zentrifugationsschritt, der Überstand und resuspendiertes Pellet wurden nebeneinander auf das Gel geladen. Hierbei stellte sich heraus, dass zwar eine hohe Expression des ROMK-GST Fusionsproteins vorhanden war, sich aber ca. 90 % der Proteinmenge in unlöslichen „Inclusion Bodies“ im Pellet wiederfanden. Um die Entstehung von „Inclusion Bodies“ zu verhindern, wurden nun verschiedene Inkubationstemperaturen (Raumtemperatur und 30°C), unterschiedliche

Konzentrationen (0,01 mmol/l, 0,02 mmol/l, 0,05 mmol/l und 0,2 mmol/l) des Induktors IPTG sowie mehrere Induktionslängen (zwischen 60 und 360 min) getestet. Trotz mehrerer Versuchsumstellungen gelang es nicht, die Bildung von „Inclusion Bodies“ zu vermeiden.

In weiteren Versuchen sollte durch Verwendung von verschiedenen Detergenzien das Fusionsprotein aus den „Inclusion Bodies“ gelöst werden. Dazu war die Herstellung von Lösungen mit Tween 20, DTT, Sarkosyl, Harnstoff und SDS nötig.

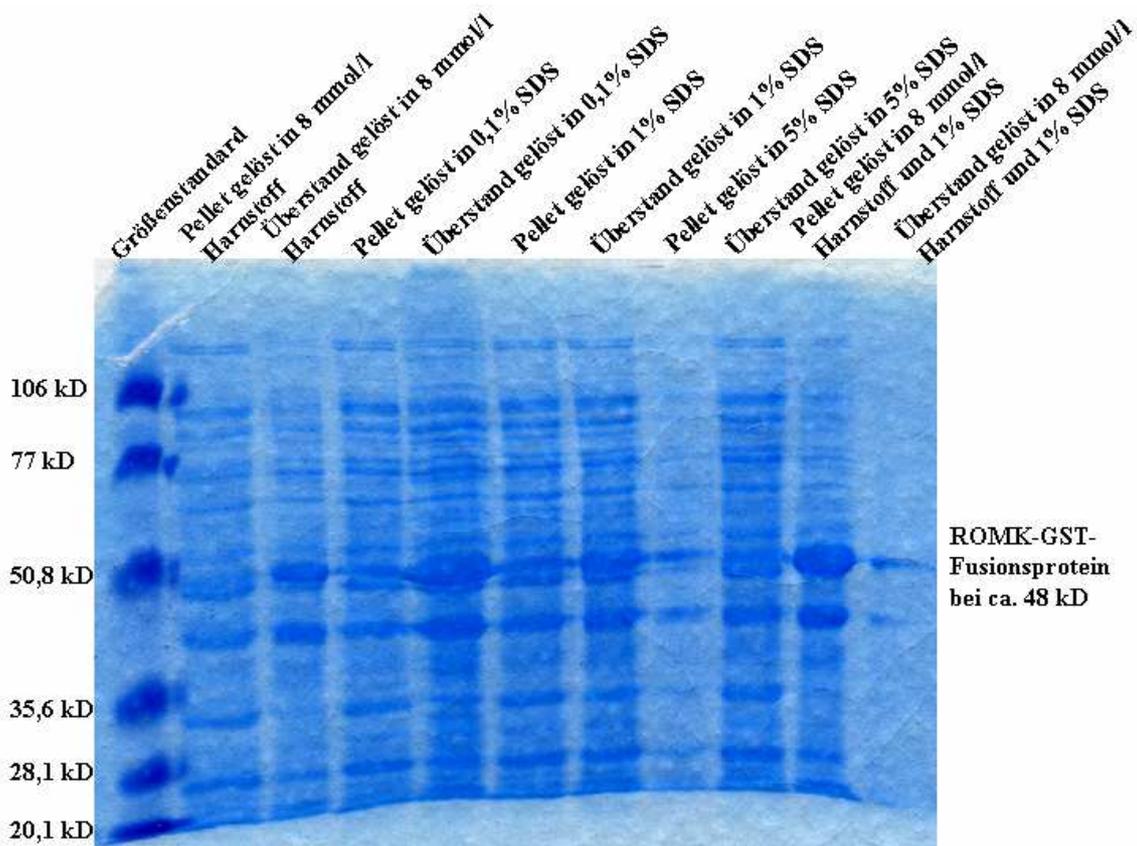


Abbildung 19: ROMK-GST Expression und Extraktion unter Verwendung verschiedener Detergenzien

Hierbei stellte sich eine Verwendung von 8 mmol/l Harnstoff und/oder 5 % SDS als einzige Methode heraus, mit der immerhin eine Lösung von annähernd 50% des Proteins aus den „Inclusion Bodies“ gelang. Sie hatte jedoch den gravierenden Nachteil,

dass das Protein davon denaturiert und somit nicht für die Untersuchung der Interaktion von ROMK mit den möglichen Partnern verwendet werden kann. Um dies zu vermeiden, da nur eine Interaktion zwischen nicht denaturiertem Proteinen gewünscht wird, wurde anstelle des GST ein 6-HIS-Epitop als neues System der Proteinaufreinigung gewählt.

Das ungekoppelte GST-Protein des leeren pGEX-4T3-Vektor konnte jedoch erfolgreich mit den oben beschriebenen Verfahren als negative Kontrolle exprimiert und extrahiert werden. Das GST-Protein wurde in Kontrollexperimenten eingesetzt, um zu beweisen, dass die Interaktion mit ROMK und nicht zwischen dem GST-Protein und dem zu prüfenden Protein stattfindet.

3.2.3 Durchführung des „GST-Pulldown“

Trotz der geringen Proteinausbeute wurden Bindungsstudien zwischen dem C-Terminus von ROMK und den zu prüfenden Proteinen durchgeführt. Es wurde sowohl das an „Beads“ gebundene ROMK-GST Fusionsprotein als auch die Negativkontrolle mit Bindungspuffer und den mit $^{35}\text{[S]}$ Methionin markierten *in vitro* Transkriptions-/Translationsprodukten von Antiquitin, Acidic Calponin und HEF1 gemischt. Die Proben verblieben 4 Stunden bei 4°C auf dem Schüttler. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Beads dreimal mit „Bead Binding Puffer“ gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Kochen in 15 µl 2x Laemmli Ladepuffer eluiert. Im nächsten Schritt folgte mit Hilfe der SDS-PAGE Gelelektrophorese die Auftrennung des Überstandes, der dann fixiert, gewaschen und mit Autofluor inkubiert wurde. Die gebundenen Proteine konnten mit Hilfe der gekoppelten Radioaktivität sichtbar gemacht werden. Auch nach 72-stündiger Belichtungszeit waren keine Proteinbanden erkennbar geworden. Mehrere Erklärungen können hierfür herangezogen werden: Einerseits wäre denkbar, dass die geringe Menge an ROMK-GST-Fusionsprotein nicht genügend Bindungskapazität besitzt, um das mögliche Interaktionsprotein in diesem Bindungsassay nachzuweisen. Andererseits kann es auch

bedeuten, dass die möglichen Interaktionspartner nicht an das ROMK-GST-Fusionsprotein binden.

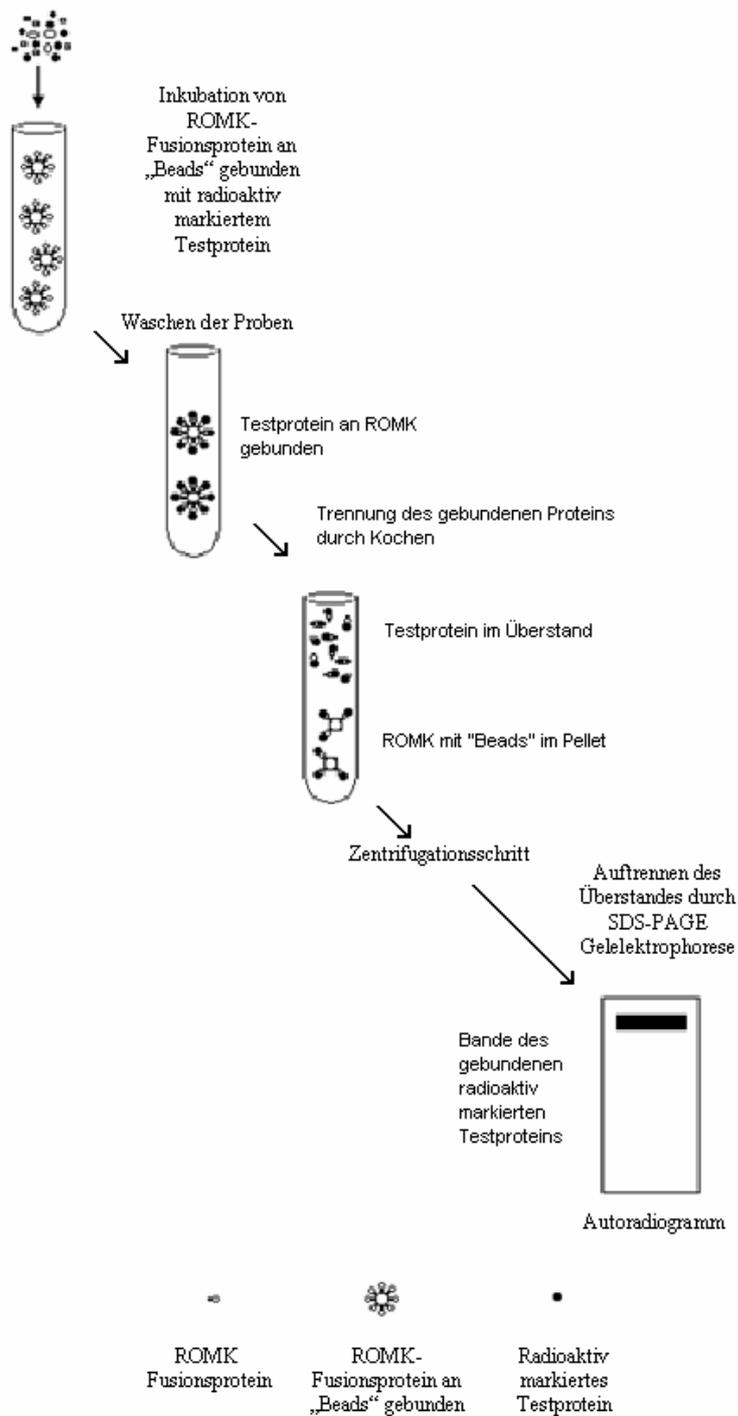


Abbildung 20: Schema zur Durchführung der Pulldown-Experimente

3.3 Der ROMK-HIS „Pull-Down“

Aufgrund der geringen Proteinexpression des ROMK-GST-Fusionsproteins und den damit verbundenen negativen Ergebnissen in den Pulldown-Experimenten wurde zu einem anderen Bindungsassay unter der Verwendung einer „HIS-Fusion“ gegriffen. Dieser Versuchsansatz bildet einen weiteren Nachweis einer möglichen Interaktion zwischen ROMK und den im Hefe-zwei-Hybrid System gefundenen Proteinen und stellt eine Alternative zu den Experimenten mit dem „GST-Pulldown“ dar.

3.3.1 Konstruktion des ROMK-HIS-Fusionsproteins

Die cDNA, die den intrazellulären C-Terminus von ROMK kodiert (Basenpaare 675-1275), wurde mit Hilfe des ROMK2S2- und des ROMKFLAG3-Primers mittels PCR erzeugt. Der ROMK2S2-Primer wurde mit einem EcoRI-, der ROMKFLAG3-Primer mit einem EcoRV-Überhang konstruiert. Nach dem Verdau des PCR-Produktes und des pcDNA3.1-HIS-C-Vektors mit den Restriktionsenzymen EcoRI und EcoRV wurden beide Fragmente aufgereinigt. Es schloss sich die Ligation des ROMK-Fragments in die Restriktionsstellen EcoRI und EcoRV des Vektors an. Die Transformation des HIS-ROMK-Plasmids in den E. coli-Stamm DH5 α folgte. Nach Analyse der Restriktionsfragmente durch Restriktionsverdau und Auftrennung durch Gelelektrophorese konnte das Plasmid zum Sequenzieren zu Genewiz Inc. (New York, USA) geschickt werden. Anschließend wurde das pcDNA3.1 HIS C-ROMK-Fusionskonstrukt in den E. coli-Bakterienstamm BL21 transformiert.

3.3.2 Expression und Extraktion des Fusionsproteins

Die Expression des ROMK-HIS-Fusionsproteins erfolgte nach den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Schritten. Zuvor konnte in mehreren Expressionsversuchen durch Veränderung der Induktionslänge mit IPTG die beste Expressionseffizienz ermittelt werden.



Abbildung 21: ROMK-HIS Expressionsversuche unter Verwendung verschiedener Expressionslängen.

Parallel zur Herstellung des ROMK-HIS Fusionsproteins wurde auch ein NEMO-HIS-Fusionsprotein als Negativkontrolle exprimiert. Das Konstrukt wurde dankenswerter Weise von Judith Glöckner gestellt und enthält die cDNA von NEMO in pcDNA3.1 HIS ligiert. NEMO (NF-kappaN Essential Modulator), ein 48 kD großes Protein, stellt eine Komponente des IkappaB-Kinasekomplexes dar, der für die Aktivierung von NF-kappaB notwendig ist [30]. Von diesem Protein konnte nach längerem Literaturstudium angenommen werden, dass es nicht spezifisch mit ROMK interagiert.

Meine Bewertung des „HIS-Pulldown“ legte ich nur dann als spezifisch fest, wenn sich eine Interaktion zwischen ROMK und den getesteten Proteinen, nicht jedoch zwischen diesen und dem Protein NEMO ergab.

3.3.3 Durchführung des „HIS Pulldown“

[³⁵S]Methionin-markiertes *in vitro*-Transkriptions-/Translationsprodukt, ROMK-HIS-Fusionsprotein bzw. NEMO als Negativkontrolle, 50 %ige Ni⁺-NTA „slurry beads“ und Interaktionspuffer wurden als Mischung für 4 Stunden unter Rotation bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschschritten der Beads mit Waschpuffer wurde 2x Laemmli Ladebuffer zu den Beads hinzugegeben. Es folgte das Kochen der Proben und die Auftrennung des Überstandes durch SDS-PAGE Gelelektrophorese. Nach Fixieren, Waschen und Autofluorbehandlung des Gels konnten die Probe durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Im HIS-Pulldown für Antiquitin1 zeigte sich bei Inkubation mit dem ROMK-HIS Fusionsprotein eine klare Bande auf der Höhe von ~60 kD, was der erwarteten Größe von Antiquitin1 entspricht. Die Negativkontrolle mit NEMO wies auf der gleichen Höhe eine erheblich schwächere Bande auf.

Für Calponin2 konnte in den HIS-Pulldown-Experimenten eine klare Bande auf der Höhe von ~36 kD aufgezeigt werden. Die Bande ist in der Negativkontrolle nur in sehr abgeschwächter Form sichtbar.

Die Ergebnisse lassen aufgrund der gefundenen klaren Banden von ~60 kD für Antiquitin1 und ~36 kD für Calponin2 auf eine spezifische Interaktion von ROMK mit diesen Proteinen schließen. Die massiv abgeschwächten Banden in den Negativkontrollen sind durch Rückstände aus den Waschschritten gut erklärbar.

HEFI konnte im „Pulldown“ mit ROMK-HIS Fusionsprotein eindeutig auf der Größe von 92 kD nachgewiesen werden. Allerdings war ebenfalls eine Bindung zu der Negativkontrolle NEMO zu beobachten, welche jedoch deutlich schwächer ausfiel. Dies ist möglicherweise ein Indiz für eine unspezifische Bindung von HEFI zu NEMO bzw. ROMK, da aufgrund der starken Bindungskapazität sowohl von HEFI zu ROMK als

auch von HEF1 zu NEMO nicht geklärt werden konnte, ob die Bindung von HEF1 zu ROMK spezifisch ist.

Es war trotz mehrerer Versuche nicht gelungen, Acidic Calponin, Shank2, ArgBP2 und POSH in der *in vitro*-Transkription/Translation in ausreichender Menge herzustellen. Daher waren mit diesen Proteinen keine Pulldownexperimente durchführbar.

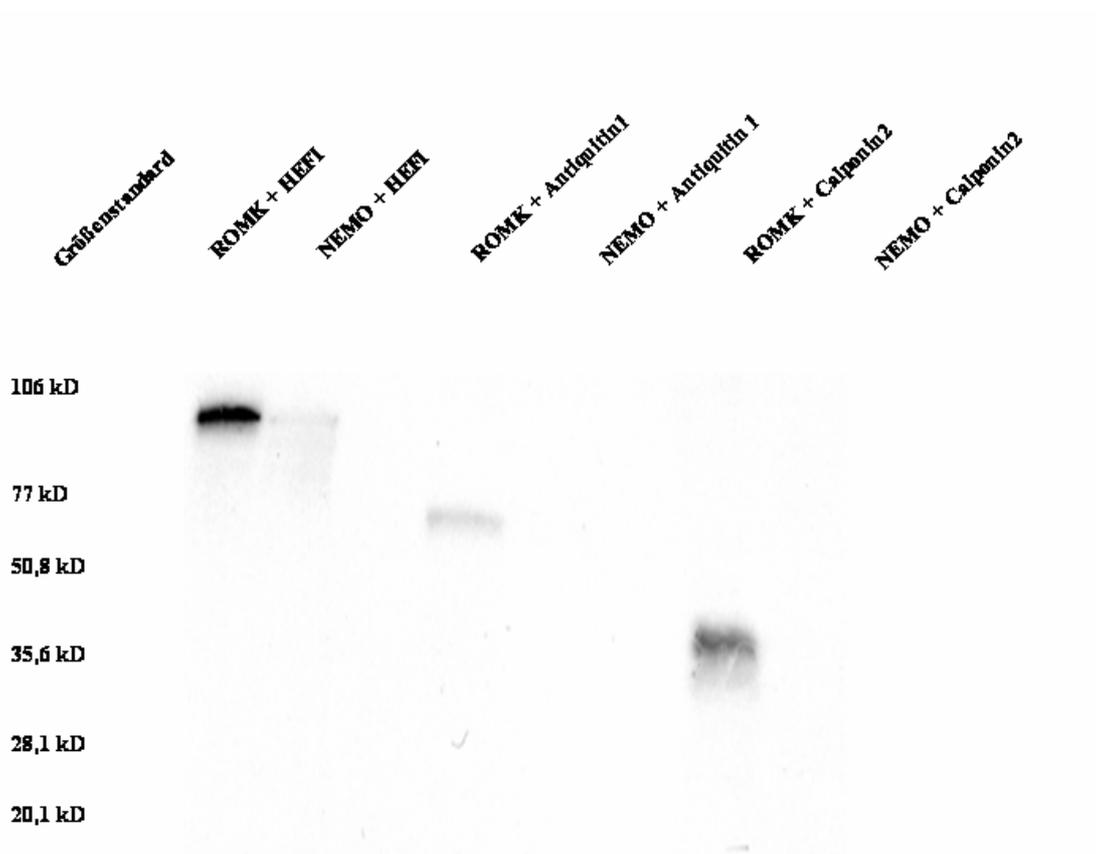


Abbildung 22: Interaktion zwischen ROMK-HIS Fusionsprotein und HEF1, Antiquitin1 und Calponin2 in einem *in vitro*-HIS Pulldown-Assay.

ROMK-HIS-Fusionsprotein sowie Nemo-HIS-Fusionsprotein (als Negativkontrolle) wurde mit den Proteinen HEF1, Antiquitin1 und Calponin2 inkubiert und nach Auftrennung durch Gelelektrophorese auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. ROMK zeigte hierbei eine spezifische Interaktion mit Antiquitin1 (Bahn3) und Calponin2 (Bahn 5). Es konnte keine Interaktion zwischen Nemo und den genannten Proteinen festgestellt werden (Bahn 4, 6). Des Weiteren war eine unspezifische

3.4 Kolokalisationsstudie mittels Immunfluoreszenz

Mit c-Myc markierte Konstrukte von Shank3, Hef1, Dia2 und ArgBP2 sowie mit HA-markierte Konstrukte von POSH, Antiquitin und Calponin wurden auf Kolokalisation mit ROMK2 untersucht.

Betrachtet man transient mit ArgAbl2 und ROMK transfizierte COS7-Zellen, zeigt sich ein perinukleäres Färbungsmuster für ROMK (z.B. Endoplasmatisches Retikulum oder Golgi-Apparat). Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da ROMK als Oberflächenprotein typischerweise an der Zelloberfläche sichtbar sein sollte. ArgAbl2 hingegen stellte sich als deutliche Oberflächenfärbung dar. Zusätzlich fand sich das Protein in intrazellulären Kompartimenten, es schien jedoch auch hier mit dem exogenen ROMK nicht zu kolokalisieren.

Bei der Ansicht von kotransfizierten Zellen mit Antiquitin1 und ROMK fiel erneut das perinukleäre Muster von ROMK auf. Antiquitin zeigte sich überwiegend intrazellulär exprimiert. Eine teilweise Überlappung beider Proteine fand sich in intrazellulären Arealen, dies bekräftigt die im „HIS Pulldown“ gesehenen Ergebnisse.

COS7-Zellen, die mit Calponin2 und ROMK transfiziert wurden, wiesen erneut ein perinukleäres Färbungsmuster für ROMK auf. Calponin lässt eine intrazelluläre Färbung, teilweise mit retikulärer Zeichnung, sichtbar werden. Dies deutet auf die Expression von Calponin im endoplasmatischen Retikulum hin. Typischerweise war keine oder nur kaum Kolokalisation beider Proteine erkennbar. In den „HIS Pulldown“-Experimenten konnte jedoch eine Interaktion beider Proteine gezeigt werden.

Bei Betrachtung der Kotransfektion von Shank3 und ROMK zeichnete sich Shank3 zum einen durch eine vesikuläre Expression an der Oberfläche der Zellen und zum anderen durch eine größtenteils intrazelluläre Lage aus. ROMK lässt erneut das gleiche intrazelluläre Muster erkennen. Auch bei Betrachtung der Proteine durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie ist kaum Kolokalisation sichtbar.

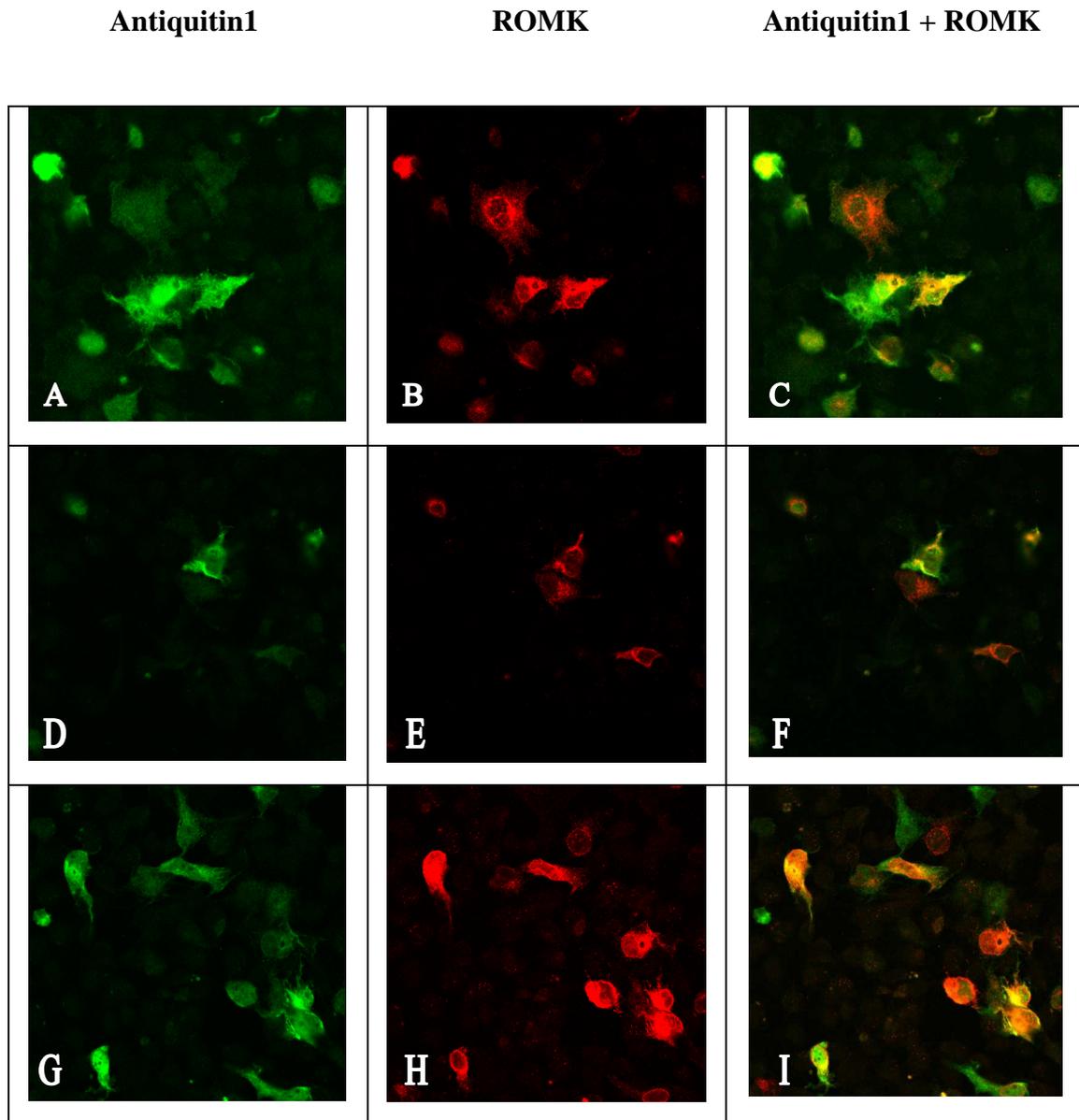


Abbildung 23: Immunfluoreszenz von ROMK und Antiquitin1

Doppelt transfizierte COS7-Zellen werden mit einem grün-fluoreszierenden Antikörper gegen Antiquitin1 (A, D, G) und einem rot-fluoreszierenden Antikörper gegen ROMK (B, E, H) markiert. Bei Kolokalisation beider Komponenten resultiert ein gelblicher Farbton (vgl. C, F, I).

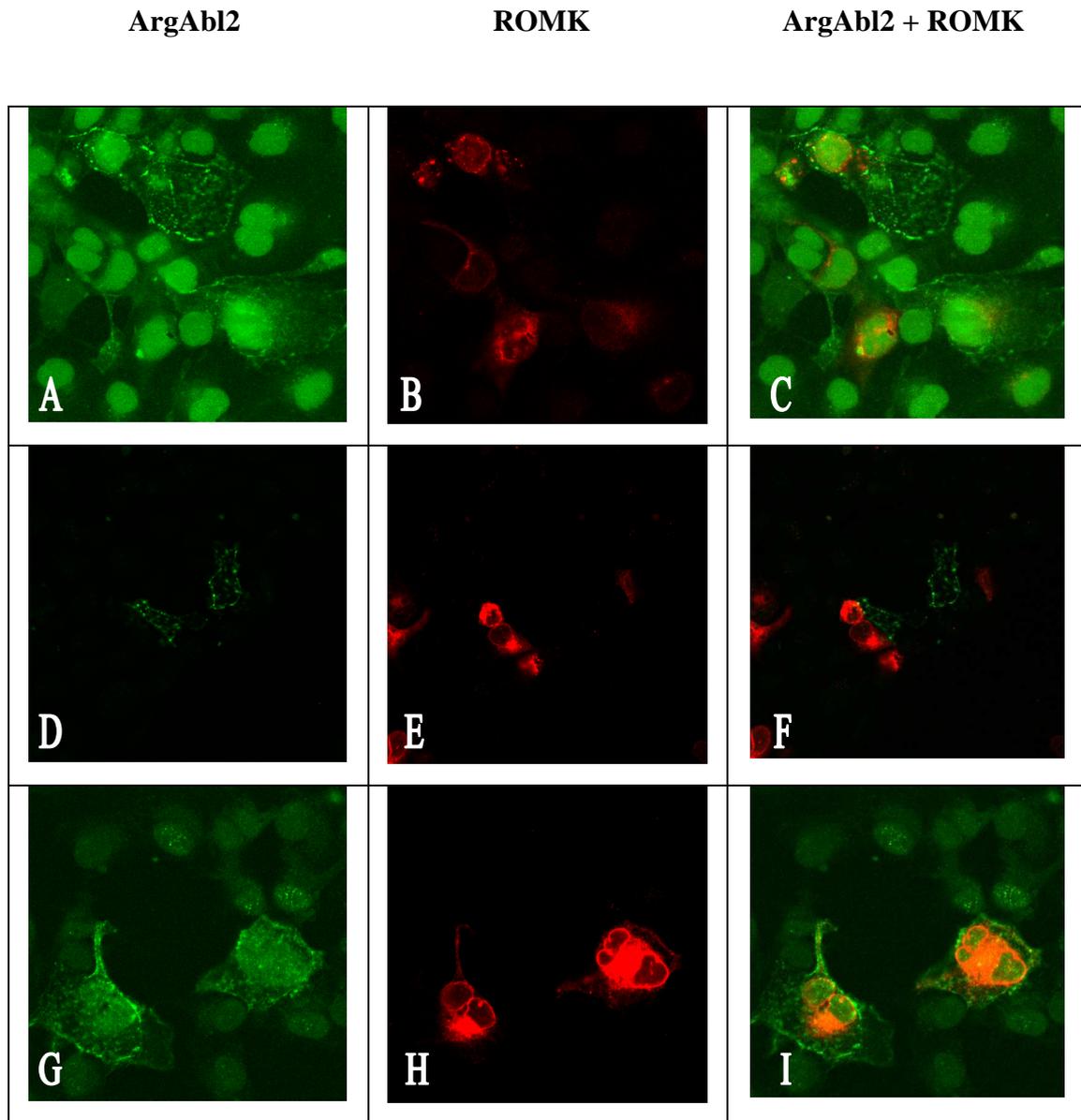


Abbildung 24: Immunfluoreszenz von ROMK und ArgAbl2

Doppelt transfizierte COS7-Zellen werden mit einem grün-fluoreszierenden Antikörper gegen ArgAbl2 (A, D, G) und einem rot-fluoreszierenden Antikörper gegen ROMK (B, E, H) markiert. Bei Kolokalisation beider Komponenten resultiert ein gelblicher Farbton (vgl. C, F, I).

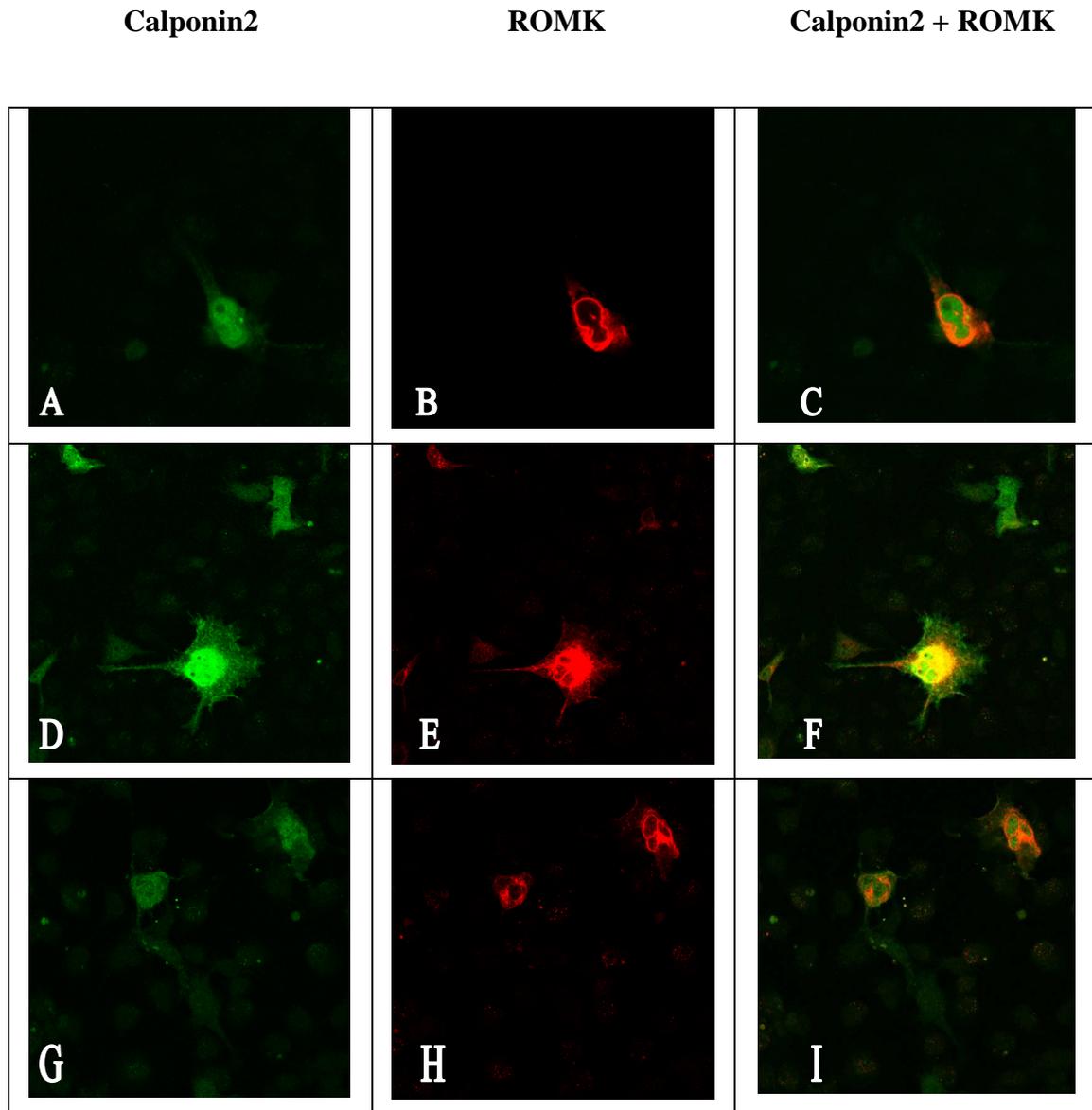


Abbildung 25: Immunfluoreszenz von ROMK und Calponin2

Doppelt transfizierte COS7-Zellen werden mit einem grün-fluoreszierenden Antikörper gegen Calponin2 (A, D, G) und einem rot-fluoreszierenden Antikörper gegen ROMK (B, E, H) markiert. Bei Kolokalisation beider Komponenten resultiert ein gelblicher Farbton (vgl. C, F, I).

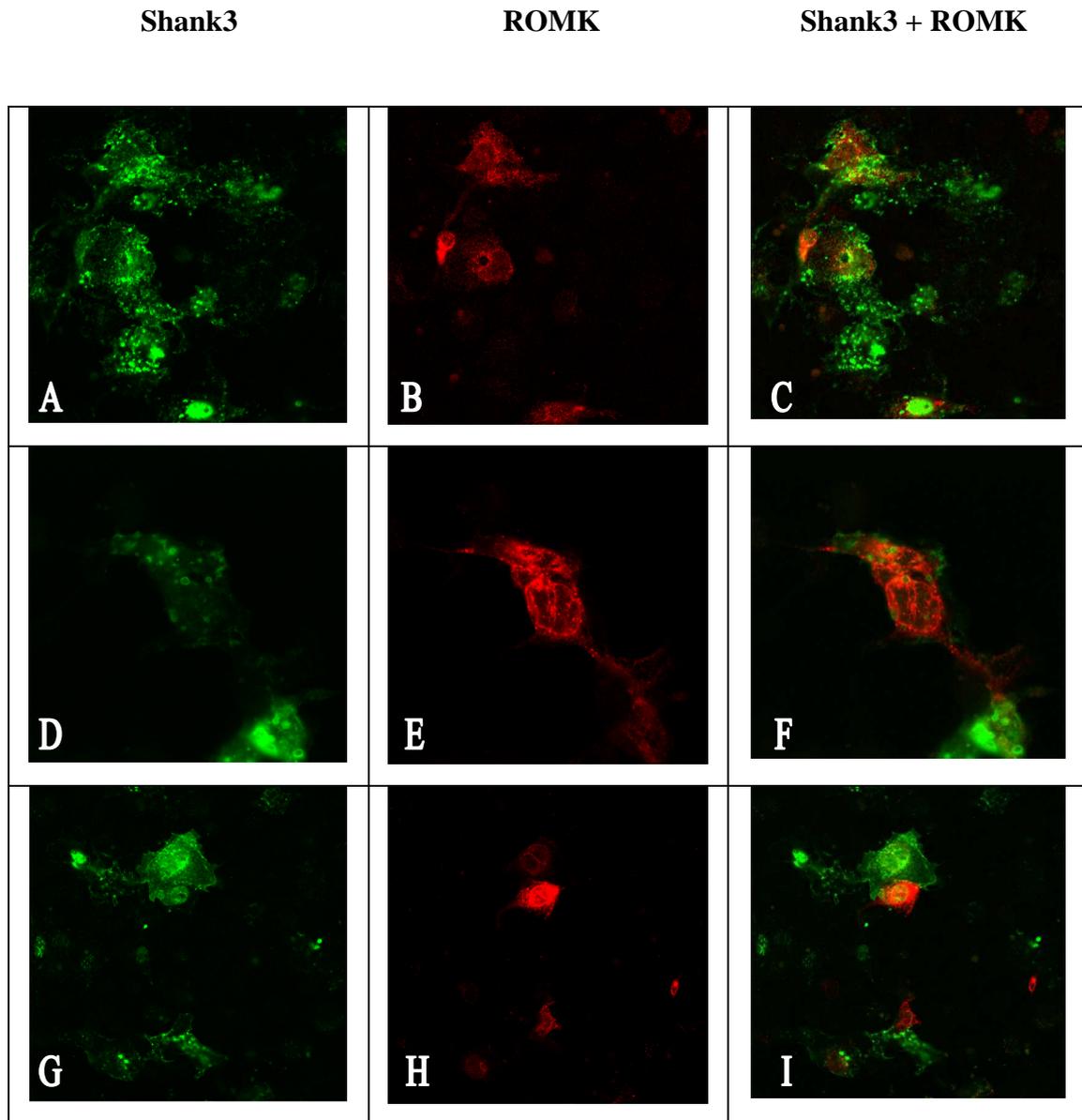


Abbildung 26: Immunfluoreszenz von ROMK und Shank3

Doppelt transfizierte COS7-Zellen werden mit einem grün-fluoreszierenden Antikörper gegen Shank3 (A, D, G) und einem rot-fluoreszierenden Antikörper gegen ROMK (B, E, H) markiert. Bei Kolokalisation beider Komponenten resultiert ein gelblicher Farbton (vgl. C, F, I).

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnten weitere Hinweise für eine mögliche Interaktion von ROMK2 mit den Proteinen Calponin2, Antiquitin, Shank und ArgBP2 erbracht werden.

Der C-Terminus von ROMK2 ähnelt sehr stark einem PDZ-Interaktionsmotiv. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass ROMK möglicherweise mit anderen PDZ-Domänen tragenden Proteinen interagiert. Anhand eines Hefe-zwei-Hybrid-Systems konnten mögliche Interaktionspartner des C-terminalen Teils (Basenpaar 675-1275) von ROMK2 gefunden werden.

GST-Pulldown-Experimente

Es gelang trotz verschiedener Protokoll-, Induktionslängen- und Detergenzienänderungen nicht, genügend ROMK-GST-Fusionsprotein zu gewinnen. Dieses Phänomen findet sich in der Literatur häufiger: In vielen Artikeln wird beschrieben, dass Proteine in einem System nicht löslich gemacht werden können und sich ein signifikanter Teil der Proteinmenge im Pellet wiederfinden lässt [31, 32]. Auch andere Methoden lassen neben dem GST-Purifikatonsystem eine Interaktion in vitro nachweisen. Zu nennen sind sowohl das Maltose-Binding-Protein-System als auch das 6-HIS-System. Deshalb erfolgte an diesem Punkt anstelle der Bemühungen, das GST-System auszureizen, ein Stop und ein Wechsel auf die alternative Technik des 6-HIS-Systems. Dieses birgt außerdem den Vorteil gegenüber der GST- oder Maltose-Binding-Protein-Purifikation mit sich, dass aufgrund der kurzen 6-HIS-Erkennungssequenz gegenüber einem ganzen Protein bei der GST-Methode eine unspezifische Interaktion weniger wahrscheinlich wird. Des Weiteren hat die Poly-HIS-Sequenz eine hohe

Affinität zu Nickel-„Beads“, was für eine schnelle und saubere Aufreinigung günstig ist.

Spezifische Interaktion von Calponin und Antiquitin mit ROMK2 anhand des in vitro-HIS-Bindungsassays

Nach dem Scheitern der GST-Affinitätspurifikation wurde der „HIS-Pulldown“ verwendet, um Interaktionen zwischen ROMK und anderen Proteinen in vitro nachzuweisen. Hierzu war es nötig, ein ROMK-HIS-Fusionsprotein zu konstruieren und durch eine Affinitätspurifikation an Nickel-„Beads“ aufzureinigen. In anschließenden Pulldown-Experimenten wurden verschiedene Proteine auf eine mögliche Interaktion mit ROMK2 untersucht. Es fanden sich Hinweise für eine spezifische Interaktion von ROMK2 mit den ^S[35]-Methionin-markiertem Proteinen Calponin und Antiquitin. In der Negativkontrolle konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. HEF I zeigte in den Pulldown-Experimenten eine mögliche unspezifische Bindung zu ROMK2, was durch eine sichtbare Interaktion mit der Negativkontrolle, NEMO, zur Darstellung kam. Acidic Calponin, Shank2, ArgBP2 und POSH konnten trotz mehrerer Versuche in der in vitro-Transkription/Translation nur mit sehr geringer Effizienz hergestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass dies der Grund für die erfolglosen Pulldown-Assays von ROMK mit den genannten Proteinen ist. Auch in der Negativkontrolle konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

Meine Ergebnisse liefern damit weitere Hinweise, dass die im Hefe-zwei-Hybrid System beobachtete Interaktion zwischen ROMK und HEF1, Antiquitin1 und Calponin2 auch in vivo von Bedeutung sein kann.

Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz

Um die physiologische Bedeutung der bisherigen in vitro-Befunde (Hefe-zwei-Hybrid System und „Pulldown-Experimente“) näher untersuchen zu können, musste als nächster

Schritt die Interaktion von ROMK und den getesteten Proteinen in einem eukaryontischen Zellsystem untersucht werden. Ein erster Schritt bildet dabei die Frage nach der Kolo-kalisation von ROMK und den getesteten Proteinen. Zu diesem Zweck wurde ROMK gemeinsam mit jeweils einem der potentiellen Interaktionspartner in COS7-Zellen exprimiert und Doppel-Immunfärbungen gegen die Proteine durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind nur unter Vorbehalt zu interpretieren, da es nicht gelang, ROMK in seinem physiologischen Kompartiment, der Plasmamembran, zu exprimieren. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen sind vielfältig. Häufig kommt es bei Überexpression exogener Proteine zu einer Übersättigung der zellulären Verteilung, was in einer Retention im endoplasmatischen Retikulum resultiert. Des Weiteren reagiert die Expression mancher Proteine sehr sensibel auf das Vorhandensein und die Zusammensetzung untranslatierter Enden am 5'- und 3'- Ende. Dies kann Einfluss auf die Sekundärstruktur und Stabilität der mRNA haben. Möglicherweise lassen sich durch Modifikation dieser Enden bessere Ergebnisse erzielen. Die Verteilung vieler Membranproteine ist von der Anwesenheit anderer, interagierender Protein in ausreichender Menge abhängig. Im Falle von ROMK2 wäre es z.B. denkbar, dass ROMK1 oder ROMK3 diese Rolle übernehmen, da diese natürlicherweise gemeinsam in den meisten Geweben exprimiert werden. Es wäre durchaus vorstellbar gewesen, dass eines der im Hefe-zwei-Hybrid gefundenen Proteine diese Funktion erfüllt. Die in den Immunfluoreszenzversuchen gefundenen Ergebnisse machen dies jedoch für die in der Arbeit untersuchten Proteine (ArgAbl2, Antiquitin1, Calponin2 und Shank3) sehr unwahrscheinlich. Des Weiteren könnte auch in der Methode der Immunfärbung eine weitere Fehlerquelle stecken. Selbst die Möglichkeit, dass ROMK durch die Permeabilisierung der Zellen vor der Antikörperbehandlung aus der Zellmembran gewaschen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden.

Nach Abschluss meiner Experimente wurde von Yoo, D. und Welling P. [33] eine Arbeit veröffentlicht, die eine Interaktion zwischen ROMK und NHERF (vgl. Tabelle S.10), einem im Hefe-zwei-Hybrid-System gefundenen Protein, via PDZ-Interaktion darstellt. In den darin geschilderten Immunfluoreszenzversuchen trat ein ähnliches Verteilungsmuster von ROMK in COS7-Zellen auf. Auch hier konnte ROMK kaum in

der Plasmamembran exprimiert werden, stattdessen kam es zu Akkumulationen im endoplasmatischen Retikulum und auch teilweise dem Golgi Apparat. Erst nach Kotransfektion von ROMK mit NHERF konnte eine dramatische Steigerung der Oberflächenexpression von ROMK nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ROMK über eine PDZ-Interaktion mit NHERF und NHERF über ein zweites PDZ-Interaktionsmotiv mit CFTR interagiert, was möglicherweise auch zur Koordination der Oberflächenexpression von ROMK beiträgt.

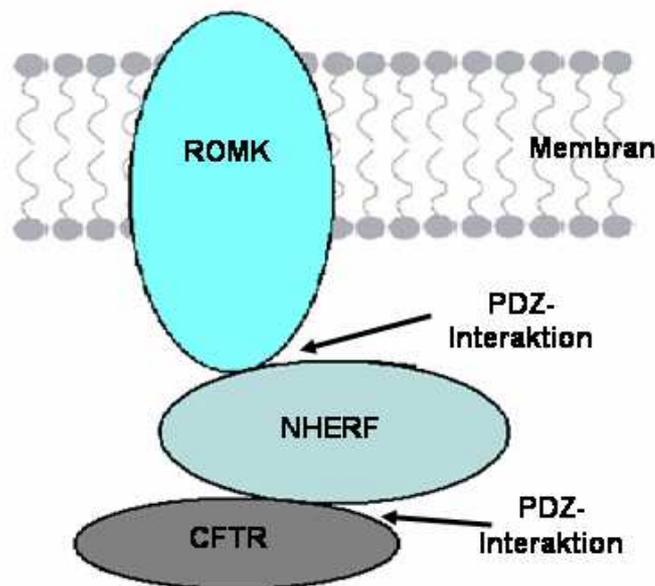


Abbildung 27: Modell der möglichen Interaktion von ROMK, NHERF und CFTR, welche via PDZ-Interaktion einen Komplex bilden (Modell nach der Arbeit von Yoo, D. und Welling, P.).

Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass ähnliche PDZ-basierte Interaktionen möglicherweise andere Proteine in multimeren ROMK-Komplexe rekrutieren um eine physiologische Regulation des Kanals zu erreichen.

Calponin bildet eine Familie von 32-kDa großen Proteinen, die in vitro an F-Aktin, Tropomyosin und Ca^{2+} -bindende Proteine bindet. Das aus 309 Aminosäuren bestehende Protein der im Hefe-zwei-Hybrid identifizierten neutralen Isoform, Calponin2 (h2 CaP), wurde erstmals aus dem menschlichen Herzen isoliert. Die mRNA wird in kultivierten glatten Muskelzellen, in Fibroblasten, in Endothelzellen und in Keratinozyten exprimiert. Im Protein wurden drei gemeinsame Wiederholungen von 29 Aminosäuren, eine Vav-homologe Region und eine Aktin-bindende Sequenz nachgewiesen. Außerdem scheint eine immunoreaktive Form des neutralen Calponins mit Vinculin in Zell-Zell Kontakten von Kardiomyozyten zu lokalisieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neutrales Calponin eine „non-smooth muscle“ Isoform darstellt und eine physiologische Rolle in der Organisation des Zytoskeletts spielt [34]. Ebenso wurde gezeigt, dass h2 CaP sowohl auf den Membraneinbau als auch auf die Motilität von Zellen Einfluss nimmt [35].

Dies lässt vermuten, dass Calponin2 in einer möglichen Interaktion mit ROMK als Gerüstprotein für ROMK2 in Erscheinung tritt. Es könnte eine mögliche Verbindung zwischen dem an der apikalen Membran gelegenen ROMK und dem Zytoskelett aufbauen und somit eine Unterstützung für die Verteilung und den Membraneinbau von ROMK bilden.

Antiquitin1 ist ein bisher wenig untersuchtes Protein. Seine cDNA weist hohe Homologie zur cDNA der „green garden pea“ (*Pisum sativum*) auf, welches auch als „26g pea turgor protein“ bezeichnet wird. Das menschliche Protein hat ein Molekulargewicht von ~55 kD und wurde aufgrund seiner bemerkenswerten Stabilität in der Evolution Antiquitin genannt. Das Auftreten von mRNA in verschiedenen

Gewebe von Mensch und Ratte weist das höchste Vorkommen in Rattenniere und – leber und in kultivierten menschlichen Hepatozyten sowie Nierenzellen auf. Beide Gewebetypen haben die wichtige Transportfunktion gemeinsam.

Nur geringe Mengen wurden in menschlichen peripheren Leukozyten, in der Rattenlunge sowie in kultivierten menschlichen Fibroblasten gefunden. Bei Untersuchungen der menschlichen, fetalen cDNA Bibliothek der Cochlea wurde eine cDNA, die eine sehr hohe Homologie mit Antiquitin1 aufweist, identifiziert [36].

Analysen der Aminosäuresequenz haben ergeben, dass Antiquitin eine homologe Region zur Aldehyddehydrogenase sowie eine große hydrophobe Region in der Mitte des Proteins besitzt, was einen Hinweis auf eine Transmembrandomäne gibt. Es konnten bislang keine weiteren offensichtlichen Proteinmotive gefunden werden.

Wie Lee et al. (1994) berichten, bestehen zwischen der menschlichen und der Aminosäuresequenz des pflanzlichen Homologs von Antiquitin 60%, zwischen Mensch und Maus sogar 90% Übereinstimmung. Proteine, die sich mit einem solch hohen Aminosäuresequenzanteil durch verschiedene Spezies hindurch erhalten haben, werden als „ancient conserved genes“ (Gene, die schon aus der Vorzeit stammen) bezeichnet. Für Gene wie z. B. Histone und Tubulin, die durch die Evolution hindurch erhalten blieben, wurde gezeigt, dass diese für Proteine kodieren, die eine fundamentale Rolle in der Zellbiologie spielen. Trotz des hohen Anteils an Konservierung des Proteins Antiquitin und der Zahl verschiedener Organismen, in denen es gefunden wurde, konnte die funktionelle Rolle von Antiquitin in Säugetieren noch nicht geklärt werden.

Auch für Antiquitin liegt die Vermutung nahe, dass es in einer möglichen Interaktion mit ROMK als Gerüstprotein für ROMK2 in Erscheinung tritt. Es könnte eine mögliche Verbindung zwischen dem an der apikalen Membran gelegenen ROMK und dem Zytoskelett aufbauen und somit eine Unterstützung für den Membraneinbau von ROMK bilden. Hierzu könnte unter anderem auch die Transmembrandomäne von Antiquitin dienlich sein. Ebenso wäre denkbar, dass Antiquitin durch einen anderen, bisher unbekanntem Mechanismus den Transport von verschiedensten Stoffen, z.B. Kalium, fördert. Zumindest das starke Vorkommen von Antiquitin in den Gewebearten mit hoher Transportleistung gibt Hinweise darauf.

Arg und c-Abl repräsentieren Mitglieder der Abelson Familie von Protein-Tyrosin Kinasen. In einem Hefe-zwei-Hybrid System, in dem ein Segment der C-terminalen Domäne von Arg als „Köder“ verwendet wurde, konnte ein neues Arg/Abl-bindendes Protein, ArgBP2, gefunden werden. ArgBP2 enthält drei COOH-terminale SH3 (Src homology 3)-Domänen, eine Serin- und Threonin- reiche Domäne und mehrere mögliche Abl-phosphorylierende Stellen. ArgBP2 ist in vielen verschiedenen menschlichen Gewebearten wie beispielsweise der Niere und dem Gehirn exprimiert und konnte vor allem im Herzen nachgewiesen werden. In Epithelzellen zeigt sich ArgBP2 gehäuft entlang von Stressfasern und im Nukleus; im Herzen hingegen liegt das Expressionsmaximum in den Z-Scheiben und den Sarkomeren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ArgBP2 sowohl die Rolle eines Adapterproteins besitzt, um z.B. Signalkomplexe an Stressfasern entstehen zu lassen, als auch eine mögliche Verbindung zwischen Kinasen der Abl-Familie und dem Aktin-Zytoskelett herstellen kann [37].

Neuere Studien entdeckten eine gespleißte Variante von ArgBP2, nArgBP2. Diese Form, welche die Hauptexpression im Gehirn aufweist, ist mit ArgBP2 zu 90% identisch. Der Name nArgBP2 steht für neuronales ArgBP2.

Ko-Immunopäzipitationsuntersuchungen ergaben, dass diese neue Form von ArgBP2, nArgBP2, durch seine SH3-Domänen an die prolinreichen Region von SAPAP (SAP90/PSD95-associated protein) bindet. Es kolokalisiert mit SAPAP in Synapsen des Kleinhirns. SAPAP ist sehr stark in der PSD (Post-Synaptic Density)-Fraktion angereichert und bildet mit anderen postsynaptischen membran-assoziierten Guanylatkinasen eine durch Triton X-100 nicht aufzulösende Struktur. Man vermutet, dass nArgBP2 Teil dieses Proteinnetzwerk mit SAPAP in der Postsynapse ist [38].

Bringt man dies in Zusammenhang mit ROMK liegt die Vermutung nahe, dass ArgBP2 durch seine vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten zum einen für den Einbau und die Stabilität in der Membran zuständig sein und zum anderen durch Verbindung zu möglichen Signalkomplexen eine Rolle in der Aktivitätssteuerung von ROMK spielen könnte.

Shank1, Shank2 und Shank3 bilden eine Familie von „Gerüst“-Proteinen, die durch verschiedene Interaktionen mit Membran- und zyttoplasmatischen Proteinen identifiziert wurde [39]. Shank ist ein relativ großes Protein mit einem Molekulargewicht von >200 kDa. Das Shank-Protein enthält eine Vielzahl von Domänen für die Interaktion mit anderen Proteinen. Die spezifische Lokalisation von Shank-Proteinen auf der postsynaptischen Seite von exzitatorischen Synapsen des Gehirns weist auf die wichtige Rolle von Shank in der Organisation von Zytoskelett- und Signalkomplexen bei speziellen Zellkontakten hin.

Der C-Terminus von Shank beinhaltet SAM-Domänen, welche zur Oligomerisierung von Shank beitragen können. Solche Oligomere von Shank könnten somit Querverbindungen zwischen verschiedenen Proteinkomplexen, wie z.B. den PSD-95-Komplex und „Homer-based“-Komplex auf postsynaptischer Seite, erlauben [40].

Zwei Proteine, für die eine Bindung zu der Prolin-reichen Region von Shank nachgewiesen werden konnte, sind Homer und Cortactin. Homer wird zu einer effizienten Signalkaskade zwischen mGluR- und IP3-Rezeptoren benötigt. Cortactin spielt eine wichtige Regulationsrolle in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts im Zellkortex und den Fortsätzen von Dendriten [41].

Die am besten charakterisierte Interaktion der PDZ-Domäne von Shank ist die Interaktion mit GKAP [38]. GKAP repräsentiert eine Familie von verschiedenen PSD-Proteinen, auch als SAPAPs oder DAPs bekannt, mit bisher unbekannter Funktion. Sie binden direkt an die postsynaptischen „scaffold“-Proteine PSD-95, S-SCAM sowie ArgBP2 [38, 40].

Möglicherweise entsteht so ein sehr interessantes Modell für ROMK, da in dem mit ROMK durchgeführten Hefe-zwei-Hybrid Screen sowohl Shank als auch ArgBP2 als Bindungspartner gefunden wurden. Aufgrund der Homologie von ArgBP2 und nArgBP2 in den interagierenden Domänen wäre durchaus auch eine Interaktion für Shank und ArgBP2 denkbar. So wird die Bindung an die PDZ-Domäne von Shank durch den C-Terminus von GKAP vermittelt [40]. Eine Interaktion zwischen ArgBP2 und SAPAPs wurde schon gefunden. Diese Informationen könnten auf ein mögliches Netzwerk für Shank hindeuten, das sowohl für die zytoplasmatische Verankerung, als

auch für die Komplexbildung des einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanals ROMK mitverantwortlich ist, da dieser über die mögliche PDZ-Domäne im C-Terminus mit Shank interagieren könnte (vgl. Modell S. 63).

Das beschriebene Modell basiert lediglich auf Vermutungen. Eine genaue Antwort, ob diese Vernetzung stattfindet und welche Funktion sie innehaben würde, kann aufgrund der jetzigen Ergebnislage nicht gegeben werden.

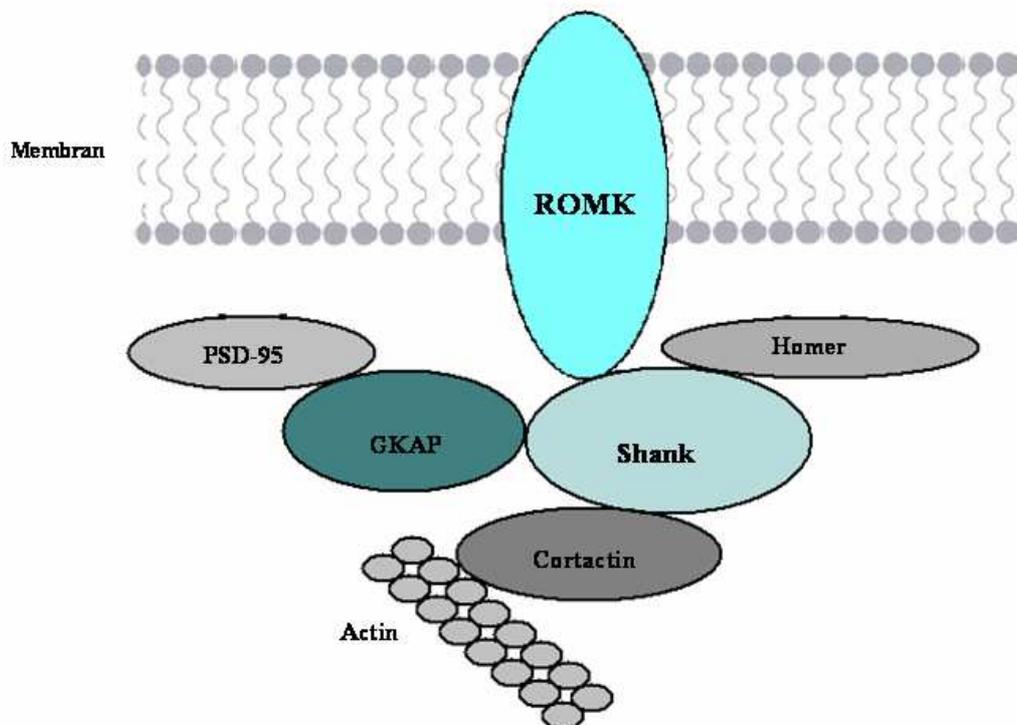


Abbildung 28: Modell der durch Shank vermittelten bekannten Interaktion mit einer möglichen Rolle von ROMK.

In dem mit ROMK durchgeführten Hefe-zwei-Hybrid Screen wurde Shank als Bindungspartner gefunden. Diese Information könnte auf ein mögliches Netzwerk für Shank hindeuten, das sowohl für die zytoplasmatische Verankerung, als auch für die Komplexbildung des einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanals ROMK mitverantwortlich ist. Dieses Modell zeigt, unter Miteinbeziehung der bereits bekannten Interaktion von Shank, eine mögliche Rolle von ROMK.

Um weitere Klarheit über die Interaktion von ROMK und den untersuchten Proteinen zu erhalten, wäre ein weiterer Bindungsassays, wie z.B. die Ko-Immunopräzipitation, wünschenswert. Ebenso interessant wären weitere Informationen über die zellbiologischen Eigenschaften von ROMK. Wie ist z.B. die Verteilung in verschiedenen Zellen, wenn ROMK allein oder in Kombination mit den in meiner Arbeit untersuchten Proteinen exprimiert wird. Gleichmaßen wäre eine elektrophysiologische Untersuchung von ROMK-Kanälen, z.B. in *Xenopus laevis* Oozyten von großem Interesse. Das Oozytenexpressionssystem ist eine sehr sensitive Messmethode, mit der bereits kleine Änderungen der Kanalaktivität und/oder der Zahl der Plasmamembrankanäle detektiert werden können. So würden bereits geringe Veränderungen des ROMK-Stromflusses auf eine physiologische Funktion der Interaktionspartner hinweisen und damit indirekt eine Interaktion bestätigen.

5 Zusammenfassung

ROMK ist ein einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal, der hauptsächlich in der Niere exprimiert wird. Er wird dabei vor allem in der apikalen Membran des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr exprimiert. Die Hauptaufgaben von ROMK bestehen in der Rezirkulation von Kalium im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife und der Kaliumsekretion im kortikalen Sammelrohr [9, 14].

ROMK wurde kloniert und in Oozyten exprimiert. Die Expression sowie Struktur- und Funktionsstudien haben viele Informationen über die Biophysik und die Regulation dieses Kanals gebracht. Dennoch ist bisher wenig über die für den Transport zur apikalen Membran von Epithelzellen verantwortlichen Mechanismen des Kanals bekannt. Der C- Terminus von ROMK ist aufgrund einer sehr hohen Homologie zu einem PDZ-Motiv ein möglicher Teilnehmer an Protein- Protein Interaktionen. In einem Hefe-zwei-Hybrid Screen wurden verschiedene mögliche Interaktionspartner gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Interaktion zwischen einigen im Hefe-System gefundenen Proteinen und dem Kanalprotein zu identifizieren, verifizieren und charakterisieren. In dem in vitro HIS- Pulldown Assay konnten die im Hefe-zwei-Hybrid System gefundenen Interaktionen zwischen ROMK und HEF1, Antiquitin1 sowie Calponin2 bestätigt werden. Ebenso war es möglich, durch Kollokalisationsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz weitere Anhaltspunkte für eine mögliche Interaktion von ROMK und Antiquitin1, Calponin2, Shank und ArgBP2 zu liefern.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die gefundenen Interaktionspartner zum einen für den Einbau und die Stabilität von ROMK in der Membran zuständig sein und zum anderen durch Verbindung zu möglichen Signalkomplexen, z.B. durch ArgBP2, eine Rolle in der Aktivitätssteuerung von ROMK spielen könnten.

6 Literatur

1. Stanton, B.A. and G. Giebisch, *Renal potassium transport*, in *Handbook of Physiology, Renal Physiology*, E.E. Windhager, Editor. 1992, Oxford Univ. Press: New York. 813-854.
2. Giebisch, G., G. Malnic, and R.W. Berliner, *The Kidney, 5th ed, Control of renal potassium excretion*, ed. B.M. Brenner. 1996, Philadelphia: WB Saunders Co. 371-407.
3. Koeppen, B.M., B.A. Biagi, and G.H. Giebisch, *Intracellular microelectrode characterization of the rabbit cortical collecting duct*. *Am J Physiol*, 1983. **244**: F35-47.
4. Horisberger, J.D., et al., *The collecting tubule of Amphiuma. II. Effects of potassium adaptation*. *Am J Physiol*, 1987. **253** F1273-1282.
5. Giebisch, G., *Renal potassium channels: an overview*. *Kidney Int*, 1995. **48**: 1004-1009.
6. Clausen, T., *Long and short-term regulation of the Na⁺, K⁺ pump in the skeletal muscle*. *New Physiol Sci*, 1996. **11**: 24-30.
7. Romero, M.F. and W.F. Boron, *Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: Cloning and physiology*. *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: 699-723.
8. Wang, W., H. Sackin, and G. Giebisch, *Renal potassium channels and their regulation*. *Annu Rev Physiol*, 1992. **54**: 81-96.
9. Hebert, S.C., *An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK)*. *Kidney Int*, 1995. **48**: 1010-1016.
10. Greger, R., *Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron*. *Physiol Rev*, 1985. **65**: 760-797.
11. Berliner, R.W., *Renal mechanisms for potassium excretion*. *Harvey Lect*, 1961. **55**: 141-171.
12. O'Neil, R.G., *Aldosterone regulation of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct*. *Semin Nephrol*, 1990. **10**: 365-74.
13. Strieter, J., et al., *A mathematical model of the cortical collecting tubule of the rabbit*. *Am J Physiol*, 1992. **263**: F1063-F1075.
14. Ho, K., et al., *Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel*. *Nature*, 1993. **362**: 31-8.
15. Boim, M.A., et al., *ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms*. *Am J Physiol*, 1995. **268**: F1132-1140.
16. Hirsch, J. and E. Schlatter, *K channels in the basolateral membrane of the rat cortical collecting duct are regulated by a cGMP-dependent protein kinase*. *Pflugers Arch*, 1995. **429**: 338-344.
17. Kubo, Y., et al., *Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel*. *Nature*, 1993. **362**: 127-133.

18. Kenna, S., et al., *Differential expression of the inwardly-rectifying K-channel ROMK1 in rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **24**: 353-356.
19. Cho, K.O., C.A. Hunt, and M.B. Kennedy, *The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein*. Neuron, 1992. **9**: 929-942.
20. Flannning, A.S. and J.M. Anderson, *PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane*. The Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**: 767-772.
21. Kim, E., et al., *Clustering of the Shanker-type K⁺ channels by direct interaction with the PSD-95/SAP90 family of membrane-associated guanylate kinases*. Nature, 1995. **378**: 85-88.
22. Kim, E., et al., *Heteromultimerization and NMDA receptor clustering activity of Chapsyn-110, a novel member of the PSD-95 family of synaptic proteins*. Neuron, 1996. **17**: 103-113.
23. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and Alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains*. Cell, 1996. **84**: 757-767.
24. Lee, W.S. and S.C. Hebert, *ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. I. Expression in rat distal nephron segments*. Am J Physiol, 1995. **268**: F1124-1131.
25. Xu, Z.C., Y. Yang, and S.C. Hebert, *Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**: 9313-9319.
26. Rubin, C.S., *A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1224**: 467-479.
27. Fuller, C.M. and D.J. Benos, *Cftr!* Am J Physiol, 1992. **263**: C267-286.
28. McNicholas, C.M., et al., *Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: 8083-8088.
29. Ruknudin, A., et al., *Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel*. J Biol Chem, 1998. **273**: 14165-14171.
30. May, M.J., et al., *Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the Ikappa B kinase complex*. Science, 2000. **289**: 1550-1554.
31. Valiyaveetil, F.I., R. MacKinnon, and T.W. Muir, *Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA*. J Am Chem Soc, 2002. **124**: 9113-9120.
32. Luo, Z.H. and Z.C. Hua, *Increased solubility of glutathione S-transferase-P16 (GST-p16) fusion protein by co-expression of chaperones groes and groel in Escherichia coli*. Biochem Mol Biol Int, 1998. **46**: 471-477.
33. Yoo, D. et al., *Assembly and Trafficking of a Multiprotein ROMK (Kir 1.1) Channel Complex by PDZ Interactions*. J Biol Chem, 2004. **279**: 6863-6873.
34. Masuda, H. et al., *Molecular cloning and characterization of human non-smooth muscle calponin*. J Biochem (Tokyo), 1996. **120**: 415-424.

35. Danninger, C. and M. Gimona, *Live dynamics of GFP-calponin: isoform-specific modulation of the actin cytoskeleton and autoregulation by C-terminal sequences*. Journal of Cell Science, 2000. **113**: 3725-3736.
36. Skvorak, A.B., et al., *An ancient conserved gene expressed in the human inner ear: identification, expression analysis, and chromosomal mapping of human and mouse antiqutin (ATQ1)*. Genomics, 1997. **46**: 191-199.
37. Wang, B., E.A. Golemis, and G.D. Kruh, *ArgBP2, a multiple Src homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and localized in stress fibers and cardiocyte Z-disks*. J Biol Chem, 1997. **272**: 17542-17550.
38. Kawabe, H. and et. al., *nArgBP2, a novel neural member of ponsin/ArgBP2/vinexin family that interacts with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein (SAPAP)*. J Biol Chem, 1999. **274**: 30914-30918.
39. Naisbitt, S. and et. al., *Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin*. Neuron, 1999. **23**: 569-582.
40. Sheng, M. and E. Kim, *The Shank family of scaffold proteins*. J Cell Sci, 2000. **113**: 1851-1856.
41. Du, Y. and et. al., *Identification of novel cortactin SH3 domain binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons*. Mol Cell Biol, 1998. **18**: 5838-58351.

Danksagung

Mein großer Dank an dieser Stelle gilt Herrn Professor Dr. med. A. Schwab für die spontane und freundliche Annahme dieser Arbeit und die jederzeit geduldige Bereitschaft, mir bei all den größeren und kleineren Problemen seine kompetente Hilfe anzubieten.

Herzlicher Dank an Herrn Professor M. J. Caplan, MD, PhD und Herrn Professor Dr. med. G. Giebisch für die Möglichkeit den experimentellen Teil meiner Arbeit in den Laboratorien des Department of Cellular & Molecular Physiology, Yale University, School of Medicine, New Haven, CT, USA ausführen zu dürfen. Das Angebot optimaler Forschungsbedingungen hat es mir ermöglicht, mich in das interessante Gebiet der Nierenphysiologie einzuarbeiten.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Department of Cellular & Molecular Physiology, Yale University, School of Medicine, für die freundliche Aufnahme und die positive Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. med. P. Pagel für die Einweisung in die verschiedenen Labortechniken, die jederzeit freundliche Zusammenarbeit und viele ergebnisreiche Diskussionen bedanken.

Mein Dank an Herrn Professor Dr. med. M. Gekle für die Übernahme des Korreferats, sowie Herrn Professor Dr. med. S. Silbernagl für die Möglichkeit in seinem Institut arbeiten zu dürfen.

Diese Arbeit ist für mich ein Anlass, mich bei alle denen zu bedanken, die mir geholfen haben, meine Pläne zu verwirklichen. Ich danke meiner Familie für die stets geduldige und verständnisvolle Unterstützung und meinen Lehrern, Betreuern und Freunden für ihre Zuwendung!

Hans Ulrich Kerl

Römerbrunnenweg 19

91781 Weißenburg

Tel.: 09141/71423

Email: Ulrich.Kerl@gmx.de

Lebenslauf

Persönliche Daten: Hans Ulrich Kerl
geb. 07.02.1977 in Weißenburg
ledig

Schulbildung:	1983 – 1987	Grundschule Weißenburg
	1987 – 1994	Werner-von-Siemens-Gymnasium, Weißenburg
	1994 – 1996	Gabrieli-Gymnasium, Eichstätt
	18.06.1996	Abitur am Gabrieli-Gymnasium, Eichstätt

Militärdienst:	01.09.96 – 01.12.96	Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
	01.12.96 – 30.06.97	Heeresmusikkorps 4, Regensburg

Studium:	1997 – 2000	Studium der Humanmedizin, Julius- Maximilians-Universität, Würzburg Ärztliche Vorprüfung 09/1999 1. Staatsexamen 08/2000
	2000 – 2001	Auslandsstudium an der Yale University, School of Medicine, New Haven, USA

