

Struktur- und Funktionsanalyse von Polycystin-2

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
–BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Helen Andrea Hoffmeister
aus Regensburg

Regensburg, Februar 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2003 bis November 2007 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Witzgall am Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg durchgeführt.

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. R. Witzgall

Promotionsgesuch eingereicht am: 12. 02. 2008

Promotionsprüfung am: 28.08.2008

Prüfungsausschuß:

(Vorsitzender)	Prof. Dr. M. Thomm (Ersatz für Prof. Dr. A. Kurtz)
(1. Gutachter/1. Prüfer)	Prof. Dr. R. Witzgall
(2. Gutachter/2. Prüfer)	Prof. Dr. R. Sterner
(3. Prüfer)	Prof. Dr. H. Tschochner
(Ersatzprüfer)	Prof. Dr. G. Längst

Lilly und Paula

1. Einleitung	1
1.1 Die Niere (Ren).....	1
1.2 Autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung.....	1
1.3 Struktur und Topologie von Polycystin-2.....	3
1.4 Polycystin-2 ist ein nicht selektiver Kationen-Kanal.....	5
1.5 Die subzelluläre Lokalisation von Polycystin-2.....	8
1.5.1 Die ER- bzw. Plasmamembran-Lokalisation von Polycystin-2 wird kontrovers diskutiert.....	8
1.5.2 Die Lokalisation von Polycystin-2 im Zilium.....	12
A. Zilien.....	12
B. Zilien haben eine mechanosensorische Funktion.....	13
1.6 Bindepartner von Polycystin-2.....	15
1.6.1 Polycystin-1.....	15
1.6.2 Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2.....	17
1.6.3 PIGEA-14.....	19
1.6.4 Interaktion von PIGEA-14 und Polycystin-2.....	19
1.7 Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.2 Enzyme.....	24
A. Restriktionsendonukleasen.....	24
B. DNA und RNA modifizierende Enzyme.....	25
C. Proteinasen.....	25
D. Protein modifizierende Enzyme.....	25
2.1.3 Kits.....	25
2.1.4 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.5 Geräte.....	27
2.1.6 Software.....	29
A. Programme.....	29
B. Internetdatenbanken.....	30

2.1.7 Antikörper.....	30
A. Primärantikörper.....	30
B. Sekundärantikörper.....	32
2.1.8 DNA.....	32
A. Plasmide.....	32
B. cDNA-Sequenzen/Quellen.....	36
C. Oligonukleotide.....	37
2.1.9 Zellen.....	39
A. Bakterienstämme.....	39
B. Säuger-Zelllinien.....	40
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	42
A. Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	42
B. Messung der optischen Dichte.....	42
C. Herstellung von kompetenten Zellen.....	43
D. Transformation von Bakterien.....	44
E. Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	46
2.2.2 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien.....	50
A. Kultivierung von Säuger-Zellen.....	50
B. Passagieren von Zellen.....	51
C. Zählen von Zellen.....	52
D. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	53
E. Transfektion von Zellen.....	53
F. Induktion der Proteinproduktion bei stabil transfizierten Zellen.....	56
G. Herstellen von Säuger-Zelllysat.....	57
H. Gewinnung von Mikrosomen („inside-out-vesicles“) nach Lewis et al. (2001).....	58
I. Protease-protection-Assays von Mikrosomen nach Lewis et al. (2001) und Yamaguchi et al. (2003).....	59
J. Biotinylierungsassay nach Pierce Cematical Company (2001) und Altin und Pagler (1995).....	62
K. Immunzytochemie.....	63
L. Deglykosylierungsexperimente.....	65
2.2.3 Arbeiten mit DNA.....	67

A. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> für analytische Zwecke („Minipräparation“)	67
B. Präparative Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> („Midipräparation“)	68
C. Konzentrationsbestimmung von DNA	69
D. Phenolisierung von DNA	69
E. Fällung von DNA unter Standardbedingungen	70
F. Agarose-Gele	70
G. Native Polyacrylamid-Gele für DNA-Analysen	71
H. Elektroelution	72
I. Ankonzentrierung von DNA über Elutip-Säulen	73
J. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	73
K. Herstellung von „glatten Plasmid-DNA-Enden“	74
L. Primer-Annealing	76
M. PCR-Reaktion	76
N. Dephosphorylierung von Vektor-DNA mittels bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP)	79
O. Ligation	79
P. Sequenzierung	80
2.2.4 Arbeiten mit Proteinen	80
A. Bestimmung der Proteinkonzentration	80
B. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	83
C. Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	84
D. Immundetektion von Proteinen (Western-Blot)	85
E. Aufreinigung von Proteinen über Nickel-Säulen	87
F. Aufreinigung von Proteinen über Amylose-Säulen	88
G. Dialyse von Proteinlösungen	89
H. Konzentrieren von Proteinlösungen über Ultrafiltration	91
I. Abspaltung von Epitopen mittels Endoproteasen	91
J. K_d -Wertbestimmung über Fluoreszenzspektrophotometer	95
K. K_d -Wertbestimmung über Quarzmikrowaage-technik	96
L. NMR-Messungen	97
M. ICP-OES (Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma)	98

3. Ergebnisse.....	99
3.1 Topologie-Studien für humanes Polycystin-2.....	99
3.1.1 Topologische Charakterisierung von Polycystin-2 mittels Immunzytochemie und Protease-protection-Assays.....	101
A. Immunzytochemische Verfahren zur Bestimmung der Topologie der Schleifendomänen von Polycystin-2.....	104
C. Protease-protection-Assays zur Bestimmung der Topologie der Schleifendomänen von Polycystin-2.....	118
3.1.2 Topologische Charakterisierung von Polycystin-2 mittels Histochemie.....	128
3.2 Charakterisierung einer Plasmamembranexport-Signalsequenz für die humane Polycystin-2-Mutante PC2(1/703).....	131
3.2.1 Bestätigung von AS-Bereich 547-582 als Kandidatenregion.....	133
3.2.2 Eingrenzen des Exportmotivs auf 6 Aminosäuren im Bereich 572-577.....	135
3.2.3 Charakterisierung des Aminosäurebereiches 572-577 durch Alanin-Mutagenese und Zilienlokalisationsstudien.....	139
A. Alanin-Mutagenese-Studien für den Aminosäurebereich 572-577 in PC2(1/703)HA.....	140
B. Zilienlokalisationsstudien der Alanin-Mutanten von PC2(1/703)HA.....	144
3.2.4 Untersuchungen des Transportes von PC2 fl-HA und PC2(1/703)HA zum Zilium.....	147
A. Endoglykosidase H-Studien.....	147
B. Zilienlokalisationsstudien von PC2 fl-HA und PC2(1/703)HA unter Einfluss von Brefeldin A.....	149
C. Zilienlokalisationsstudien von PC2(1/703)HA unter Einfluss von Sar1a H79G und Sar1a T39N.....	154
3.2.5 Golgi-Kolokalisationsstudien von PC2 fl und PC2(1/703).....	159
3.3 Quantifizierung der Interaktion von Polycystin-2 mit Polycystin-1 und PIGEA-14 über Quarzmikrowaage-technik.....	161
3.3.1 Quarzmikrowaage-technik (QCM).....	162
3.3.2 Proteinaufreinigungen für die Quarzmikrowaage-Messungen.....	163
A. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET/21b/PKD1C.....	165
B. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET/21b/PIGEA-14.....	166
C. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET/21b/CLIM1.....	167

D. Aufreinigung des Proteinproduktes von pMAL-c2/PKD2C.....	168
3.3.3 Quarzmikrowaage-Messungen (durchgeführt von Sabine Bosk, vgl. auch Bosk, 2007).....	170
A. Interaktion zwischen dem C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) und dem C-terminalen Fragment von Polycystin-1 (PC1C).....	173
B. Interaktion zwischen dem C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) und PIGEA-14.....	176
3.4 Strukturelle Charakterisierung des C-Terminus von Polycystin-2 über NMR.....	177
3.4.1 Proteinaufreinigungen für die NMR-Messungen.....	179
A. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796).....	180
B. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET47b/PKD2(797-968).....	182
3.4.2 NMR-Untersuchungen für den C-Terminus von Polycystin-2.....	183
A. NMR-Messungen für das Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968)...	184
B. NMR-Messungen für das Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796).....	186
3.4.3 Calcium-Bindungsstudien mit dem Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796).....	190
A. Calcium-Bindungsstudien über Fluoreszenzspektroskopie.....	190
B. Calcium-Bindungsstudien über NMR.....	194
4. Diskussion.....	197
4.1 Strukturelle Charakterisierung von Polycystin-2.....	198
4.1.1 Topologische Charakterisierung von Polycystin-2.....	198
A. Polycystin-2 ist ein Protein mit 6 Transmembrandomänen.....	199
B. Alle Methoden zur Aufklärung der Topologie von Membranproteinen beruhen auf der Modifikation der entsprechenden Proteine.....	201
C. Ausblick.....	204
4.1.2 Strukturelle Charakterisierung von Polycystin-2 über NMR.....	204
A. NMR-Analysen für den C-Terminus von Polycystin-2.....	205
B. Ausblick.....	207
4.2 Funktionelle Charakterisierung von Polycystin-2.....	208

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung einer EF-Hand-Domäne im C-Terminus von Polycystin-2.....	208
A. Calcium-Bindungsstudien mit NMR.....	208
B. Calcium-Bindungsstudien mit Fluoreszenzspektroskopie.....	209
C. Ausblick.....	211
4.2.2 Interaktionsstudien mit der Quarzmikrowaage.....	211
A. Methoden zur Immobilisierung von Proteinen auf Schwingquarzen.....	211
B. Aspekte zur Etablierung der Quarzmikrowaage-Messungen.....	213
C. Interaktion von Polycystin-2 mit Polycystin-1 und PIGEA14.....	214
D. Ausblick.....	216
4.2.3 Der intrazelluläre Transport von Polycystin-2.....	216
A. Polycystin-2 besitzt ein zytoplasmatisch exponiertes Signalmotiv in Schleifendomäne 4, das für den Export zur somatischen Plasmamembran verantwortlich ist.....	217
B. Die Aminosäuren 572 und 576 spielen eine elementare Rolle in dem für die somatische Plasmamembran spezifischen Exportmotiv.....	219
C. Der Transportweg zum Zilium.....	222
D. Das Cis-Golgi-Kompartiment bildet den Ausgangspunkt für den Transport von PC2 zur ziliären und somatischen Plasmamembran sowie für den Rücktransport zum ER.....	225
E. Löst eine gestörte Hierarchie der Transportsignale den ADPKD-Phänotyp aus?.....	227
F. Ausblick.....	229
5. Zusammenfassung.....	230
6. Abkürzungsverzeichnis.....	233
7. Literatur- und Personenverzeichnis.....	240
7.1 Zitierte Literatur.....	240
7.2 Zitierte Internetadresssen.....	253
7.3 Zitierte Personen.....	253

8. Publikationsverzeichnis.....	255
8.1 Paper.....	255
8.2 Kongresse.....	255
9. Lebenslauf.....	256
10. Eidesstattliche Erklärung.....	257

1. Einleitung

1.1 Die Niere (Ren)

Die Nieren sind paarige, retroperitoneal, beidseits der Wirbelsäule gelegene Organe mit exkretorischer und endokriner Funktion. Die architektonische Grundeinheit der Niere bilden die sog. Nephrone, von denen es beim Menschen ungefähr 1-1,25 Millionen pro Niere gibt. Ein Nephron gliedert sich in das Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und das Nierenkanälchen (Tubulus nephroni). Das Corpusculum renale wiederum setzt sich aus dem Glomerulus, einem Kapillargefäßknäuel, in welches das sog. Vas afferens einmündet und das Vas efferens ausmündet, zusammen. Der Glomerulus wird von der sog. Bowman-Kapsel umschlossen, deren viszerales Blatt dem Kapillarknäuel aufliegt und deren parietales Blatt die Kapsel nach außen abgrenzt. In den Raum zwischen beiden Blättern wird der sog. Primärharn als „Protein-armes“ Ultrafiltrat abgegeben und gelangt von dort über den Harnpol (sitzt gegenüber dem sog. Gefäßpol) in das Kanalsystem. Letzteres wird in den proximalen, intermediären und distalen Tubulus unterteilt. Über den Tubulus reuniens fließt der Harn in die Sammelrohre. Die Sammelrohre wiederum münden über die Ductus papillares in die Nierenpapillen, aus denen sich der Harn schließlich in die Nierenkelche ergießt (Schiebler et al., 1997).

1.2 Autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) stellt mit einer Prävalenz von 1:1000 eine der häufigsten Erberkrankungen dar. Das phänotypische Hauptmerkmal dieser Krankheit ist die Entstehung von Zysten, deren Herkunft sowohl Nephronabschnitte als auch Sammelrohrbereiche einschließt (Gallagher et al., 2002). Die Zysten bilden flüssigkeitsgefüllte Höhlungen, die je nach Ursprung mit dem entsprechenden Epithel ausgekleidet sind (Gallagher et al., 2002). Auf zellulärer Ebene werden Veränderungen in der Zellpolarität und eine veränderte Flüssigkeitssekretion im Zystenwandepithel diskutiert (Grantham et al., 1995; Hanaoka et al., 1996; Wilson et al., 1991; Wilson et al., 2000; Charron et al., 2000). Weiterhin werden sowohl hohe Apoptose-Raten als auch hohe Mitose-Raten im Zystenwandepithel beobachtet (Gallagher et al., 2006). Im Verlauf der Krankheit expandieren die Zysten und ersetzen schließlich das gesamte Nierenparenchym (Harris, 1999). Mit dieser Zysten-Expansion geht eine Zunahme der Nierengröße um das 10 bis 14-fache einher, wobei das Nierengewicht auf bis zu 4 kg

(Normalgewicht 150 g pro Niere) ansteigen kann (Martinez und Grantham, 1995). Neben den Nierenzysten sind auch Zysten in der Leber und im Pankreas zu sehen. Weitere extrarenale Manifestationen der Krankheit sind Herzklappendefekte, intrakranielle Aneurysmen, wiederkehrende Harnwegsinfektionen und Nierensteinbildung (Martinez and Grantham, 1995). In 50% der Fälle führt ADPKD bis zum 60. Lebensjahr zu chronischem Nierenversagen. Bisher ist die einzige Therapieform die Dialyse oder die Nierentransplantation.

ADPKD ist eine genetisch gesehen heterogene Krankheit, die durch Mutationen in zwei, möglicherweise auch drei verschiedenen Genen bedingt sein kann. In ungefähr 85% der Fälle liegen Mutationen im Gen für Polycystin-1 vor, das 1994 kloniert werden konnte (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994) und für ein 11 Transmembrandomänen umfassendes Protein kodiert (vgl. auch 1.6.1). In etwa 15% der Fälle werden Mutationen im *PKD2*-Gen gefunden. Dieses Gen kodiert für ein 6 Transmembrandomänen umfassendes Protein (vgl. auch 1.3) und wurde 1996 kloniert (Mochizuki et al., 1996). Einige Patienten haben weder Mutationen im *PKD1*- noch im *PKD2*-Gen. Daher wird ein dritter Genlocus (*PKD3*) vermutet, der allerdings noch nicht lokalisiert ist (Sutters, 2006). Trotz der Tatsache, dass Patienten mit Mutationen im *PKD1*- oder *PKD2*-Gen ähnliche Phänotypen zeigen, ist der Krankheitsverlauf bei Patienten mit Mutationen in Polycystin-2 (ADPKD Typ 2) klinisch gesehen etwas milder (Veldhuisen et al., 1997).

Da bei ADPKD nur etwa 5% der Nephrone Zysten entwickeln, wurde im Hinblick auf die Tatsache, dass es sich um einen autosomal-dominanten Erbgang handelt, die sog. „second hit-Hypothese“ als Grund für die Zystenbildung formuliert. Nach dieser Hypothese muss neben der Keimbahnmutation eines der erwähnten Gene noch eine zweite, somatische Mutation in einem der betroffenen Gene stattfinden (Qian und Germino, 1997; Wu et al., 1998). Folgende Befunde lassen jedoch den Schluss zu, dass es noch weitere Gründe für Zystenbildung geben muss. So konnte nicht in allen untersuchten Zysten eine somatische Mutation des zweiten Allels detektiert werden. Ebenfalls wird berichtet, dass Polycystin-2 immunhistochemisch noch in vielen der Zystenwandepithel-Zellen nachgewiesen werden konnte (Gallagher et al., 2002).

1.3 Struktur und Topologie von Polycystin-2

PKD2, das in Typ 2 ADPKD mutierte Gen (online MIM number 173910), ist auf Chromosom 4q21-q23 lokalisiert (Peters und Sandkuijl, 1992; Kimberling et al. 1993) und konnte 1996 durch Mochizuki et al. (1996) mittels positioneller Klonierung nachgewiesen werden. Die kodierende Sequenz von *PKD2* ist auf wenigstens 15 Exone verteilt, die einen Bereich von etwa 68 kbp genomischer DNA umfassen. Der Translationsstart befindet sich in Exon 1 (Hayashi et al., 1997). Cai et al. (1999) konnten das 968 Aminosäuren umfassende Translationsprodukt (PC2) mit Hilfe polyklonaler Antiseren und Endo H-Assays als ungefähr 110 kDa großes, glykosyliertes Transmembranprotein identifizieren. Die Glykosylierungsstellen konzentrieren sich dabei auf den in das ER-Lumen ausgerichteten postulierten ersten Schleifenbereich (Swissprot-Datenbank/Mochizuki et al., 1996).

Wendet man verschiedene Hydrophobizitäts-Algorithmen auf die Aminosäuresequenz von Polycystin-2 an (Engelman und Streitz, 1981; Kyte and Doolittle, 1982), so ergibt sich folgendes Topologiemodell (siehe auch Abb. 1).

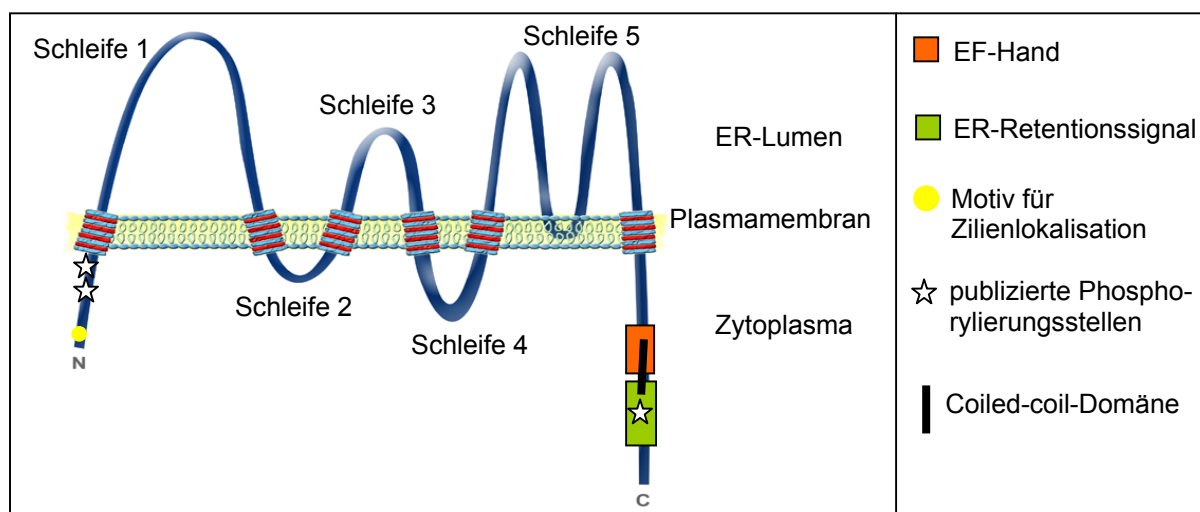


Abb. 1: Topologie-Modell für humanes Polycystin-2 (PC2).

PC2 soll 6 Transmembrandomänen besitzen, wobei der N- und C-Terminus sowie die Schleifenbereiche 2 und 4 ins Zytoplasma ragen. Die übrigen Schleifenregionen weisen zum ER-Lumen beziehungsweise in den extrazellulären Raum (vgl. Abb. 1). Dieses Modell wurde von Datenbankanalysen (Swissprot-Datenbank) mit mehr oder weniger kleinen Abweichungen für die N- und C-terminalen Begrenzungen der Transmembrandomänen bestätigt (vgl. auch Abb. 4). Auffällig im Hinblick auf die Topologie von Polycystin-2 ist die

Ähnlichkeit zu sog. TRP-Kanälen (Clapham et al., 2001; Cantiello, 2004). So zeichnen sich TRP-Kanäle (transient receptor potential) ebenfalls durch 6 Transmembrandomänen und zytoplasmatisch gelegene N- und C-Termini aus (Clapham et al., 2001). Die Porenregion bei TRP-Kanälen wird dabei von der Region zwischen Membrandomäne 5 und 6 gebildet und erwies sich als wenig selektiv gegenüber Kationen wie Calcium (Clapham et al., 2001). Ein weiterer Aspekt, der Parallelen zwischen Polycystin-2 und den normalerweise als funktionellen Homo- bzw. Heterotetrameren auftretenden TRP-Kanälen (Li et al., 2002a) erkennen lässt, ist der Befund, dass PC2 Homomere (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997; Gallagher et al., 2006) bzw. Heteromere mit TRPC-1 (transient receptor potential-Kanal der C-Subfamilie, Typ 1) bilden kann (Tsiokas et al. 1999). Polycystin-2 teilt ebenfalls homologe Sequenzabschnitte mit spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen (Mochizuki et al., 1996). So wurde eine ungefähr 270 Aminosäurereste umfassende Sequenzübereinstimmung mit dem Calcium-Kanal α_{1E} (VACC α_{1E-1}) festgestellt, welche die Transmembrandomänen 2-6, die dazwischenliegenden Schleifendomänen und ein im C-Terminus gelegenes sog. EF-Hand-Motiv (AS 754-782; vgl. Abb. 1) beinhaltet (Mochizuki et al., 1996; Cantiello, 2004). Eine EF-Hand ist ein sog. Helix-Loop-Helix-Motiv, das eine Calcium-Bindeaktivität in 70% aller Proteine zeigt, in denen es gefunden wird (Nakayama und Kretsinger, 1994). Ein Sequenzabgleich dieses Motivs aus dem C-Terminus von Polycystin-2 (vgl. Abb. 1) mit einer EF-Hand-Testsequenz (Kretsinger, 1987) zeigt, dass das PC2-Motiv an den kritischen Koordinationsstellen 1 (D), 3 (D), 5 (D), 7 (E), 9 (T) und 12 (E) die erforderlichen Aminosäuren (die angegebenen Aminosäuren entsprechen denen von hPC2) aufweist (Mochizuki et al., 1996; Gifford et al., 2007).

Ein weiteres funktionelles Element im C-Terminus von Polycystin-2 stellt ein die Aminosäuren 787-820 umspannender Bereich dar, der als ER-Retentionssignal (vgl. Abb. 1) fungieren soll und sich durch eine hohe Anzahl an sauren Aminosäuren auszeichnet (Cai et al., 1999; vgl. auch 1.5.1). Ein sog. RVxP-Motiv in den ersten 15 N-terminalen Aminosäuren des Proteins (vgl. Abb. 1) soll hingegen für den Transport des Proteins ins Zilium wichtig sein (Geng et al., 2006; vgl. auch 1.5.2). Neben den genannten Motiven sollen auch N- und C-terminale Phosphorylierungsereignisse (vgl. Abb. 1) an den Positionen 76 und 80 (N-Terminus) bzw. 812 (C-Terminus) den Transport von Polycystin-2 steuern (Köttgen et al., 2005; Streets et al., 2006). Die Serin-Reste 76 und 80 (vgl. Abb. 1 und 4) sind Bestandteil einer höchst konservierten Erkennungssequenz (Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr) für die Glykogen Synthase Kinase (GSK3), wohingegen der Serin-Rest 812 (vgl. Abb. 1 und 4) durch Casein

Kinase 2 (CK2) phosphoryliert wird (Cai et al., 2004; Köttgen et al., 2005). Folgende weitere Aminosäuren in der Sequenz von Polycystin-2 werden als potentielle Phosphorylierungsstellen postuliert (ausschließlich Serin-Reste): 74, 122, 125, 721, 801, 831 und 943 (Mochizuki et al., 1996; Streets et al., 2006). Zuletzt ist noch als strukturelle Besonderheit eine Coiled-coil-Domäne (AS 763-796; vgl. Abb. 1) im C-Terminus von Polycystin-2 zu erwähnen, die unter anderem in die Homomerbildung von Polycystin-2 involviert sein soll (Tsiokas et al., 1997).

Sequenzabgleiche mit weiteren Proteinen ergaben, dass PC2 zu 25% identisch und zu 50% ähnlich zu dem 4302 Aminosäuren langen Translationsprodukt von Polycystin-1 (PC1) ist, wobei sich der Bereich der Sequenzähnlichkeit ausschließlich über die Transmembrandomänen 1 bis 6 erstreckt (Mochizuki et al., 1996; Wilson, 2001).

1.4 Polycystin-2 ist ein nicht selektiver Kationen-Kanal

Aufgrund der unter 1.3 genannten topologischen Übereinstimmungen von Polycystin-2 mit TRP-Kanälen (transient receptor potential), wurden Polycystin-2 und zu Polycystin-2 sequenzhomologe Proteine wie PC2L1 (AF073481) oder PC2L2 (NM_014386) in die TRPP-Subfamilie der TRP-Kanäle eingeordnet (Witzgall, 2005). PC2L1, das mit 50% Identität und 71% Ähnlichkeit die höchste Sequenzhomologie zu Polycystin-2 aufweist (Mochizuki et al., 1996; Nomura et al., 1998; Cai et al., 1999), war das erste „PC2-ähnliche Protein“, das als Kationen-Kanal identifiziert wurde (Chen et al., 1999). So konnte bei Überexpression von humanem PC2L1 in *Xenopus* Oozyten (Eizellen aus Fröschen) ein nicht selektiver Kationen-Kanal, der für mono- und divalente Kationen wie Na^+ , K^+ , Ba^{2+} und Ca^{2+} durchlässig ist und sich durch eine hohe Leitfähigkeit (~ 370 pS; 110 mM KCl) auszeichnet, detektiert werden (Chen et al., 1999; Li et al., 2002b). Ein Beweis für die Kanaleigenschaften von Polycystin-2 wurde 2001 erbracht, wobei der Aminosäurebereich zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 von PC2 die Kanalpore bilden soll (Witzgall, 2005). So wurde endogenes Polycystin-2 an der apikalen Membran der Mikrovilli von humanen Synzytiotrophoblasten (hST, Plazenta) nachgewiesen, wo es die Funktion eines spannungsabhängigen, nicht selektiven Kationen-Kanals mit einer hohen Durchlässigkeit für Ca^{2+} übernimmt (González-Perrett et al., 2001). Im Mittel wurde eine mit 134 pS (150 mM KCl) recht hohe Einzelkanalleitfähigkeit gemessen, wobei diese Daten durch Rekonstitution von humanen Synzytiotrophoblasten (endogenes PC2) in Lipidmembranen und durch Patch clamp-Versuche an Sf9-Zellen

(Insekten-Zellen) ermittelt wurden, die heterologes Polycystin-2 produzierten (González-Perrett et al., 2001).

Die Befunde über die Kanalaktivität von exogenem Polycystin-2 konnten durch Patch clamp-Experimente an *Xenopus* Oozyten und mIMCD-Zellen (Sammelrohr-Zellen der inneren Medulla aus Maus-Niere) bzw. durch Lipidmembran-Experimente mit LLC-PK₁-Zellen (primäre Tubulus-Zellen aus der Schweine-Niere; vgl. 2.1.9.B) bestätigt werden (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002; Luo et al., 2003). Trotz der Tatsache, dass heterolog produziertes Polycystin-2 in *Xenopus* Oozyten und mIMDC-Zellen an der Plasmamembran detektiert wird und in LLC-PK₁-Zellen im ER nachgewiesen wurde (vgl. auch 1.5), kommen alle drei Publikationen zu dem Schluss, dass PC2 ein spannungsabhängiger, nicht selektiver Kationen-Kanal mit Einzelkanalleitfähigkeiten im Größenbereich von ~123 pS [100 mM KCl] (Vassilev et al., 2001), 116 pS [100 mM KCl] (Luo et al., 2003) bzw. ~100 pS [55 mM Barium] (Koulen et al., 2002) ist. Vassilev et al. (2001) beschreiben weiterhin eine charakteristische Kanalkinetik für Polycystin-2, die sich durch häufiges Öffnen und Schließen auszeichnet. Neben Calcium soll PC2 weiterhin für Mg²⁺ (Koulen et al., 2002), Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Rb⁺ (Vassilev et al., 2001; Luo et al., 2003), Cs⁺ und Ba²⁺ (González-Perrett et al., 2001) permeabel sein. Dieser Befund, die Durchlässigkeit für Ionen wie K⁺, Na⁺ und Ca²⁺ sowie die Tatsache, dass Polycystin-2 durch externes La³⁺ (200-250 µM), Gd³⁺ und eine Absenkung des pH-Wertes gehemmt werden kann, lassen eine hohe Ähnlichkeit zu PC2L1 erkennen (González-Perrett et al., 2001; Vassilev et al., 2001).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Polycystin-2 durch externes Amilorid (37,5 µM), einem Inhibitor von Na⁺-durchlässigen, epithelialen Kationen-Kanälen, und extrazelluläres Calcium (90 mM) gehemmt werden kann (González-Perrett et al., 2001), wobei letzteres durch Daten von Vassilev et al. (2001) bestätigt werden konnte, die ebenfalls eine Inhibierung von Polycystin-2 durch Calcium-Konzentrationen im millimolaren Bereich beobachten. Dieses Phänomen wurde bereits bei anderen Calcium-permeablen TRP-Kanälen beobachtet und soll möglicherweise exzessiven Calcium-Einstrom verhindern (Hoenderop et al., 1999; Nilius et al., 2002). Trotz der Ähnlichkeit zu spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen (Mochizuki et al., 1996) kann Polycystin-2 jedoch nicht durch Nifedipin (10 mM), einem Hemmer von spannungsgesteuerten, plasmamembranständigen Calcium-Kanälen oder durch Rutheniumrot (2 µM), einem Inhibitor von Ryanodinrezeptoren geblockt werden (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002). Weiterhin reagiert Polycystin-2 auch nicht sensitiv gegenüber

Modulatoren von intrazellulären Calcium-Kanälen wie IP₃ [20 µM] bzw. Ryanodin [20 µM] (Vassilev et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei PC2 um einen neuen Kanaltyp handelt.

Die Kanalaktivität von Polycystin-2 soll allerdings durch Änderungen der intrazellulären Konzentration an freiem Calcium regulierbar sein. So wird beschrieben, dass die zytoplasmatische Applikation von Calcium in einem Bereich von 0,1-1 µM (physiologischer Bereich der [Ca²⁺]_i: 0,1-10 µM) eine transiente Erhöhung der Aktivität hervorruft (Vassilev et al., 2001). Die Kanalregulierung durch intrazelluläres Calcium konnte durch eine zweite Publikation bestätigt werden. In dieser wird allerdings ein etwas größerer Konzentrationsbereich von 0,01-1260 µM Calcium angegeben, in dem eine Erhöhung der „Offen-Wahrscheinlichkeit“ des Kanals zu dokumentieren ist, wobei ein Überschreiten der oberen Konzentrationsgrenze zum Absinken der „Offen-Wahrscheinlichkeit“ führt (Koulen et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für PC2L1 gemacht (Chen et al., 1999). So soll auch hier eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration die Ursache für eine Steigerung der Kanalaktivität sein, wobei allerdings die Kanalaktivität nicht wie bei Polycystin-2 zum Ausgangsniveau, sondern zu Werten deutlich darunter zurückkehrt (Chen et al., 1999; Vassilev et al., 2001).

Im Falle von PC2L1 konnte dabei eindeutig gezeigt werden, dass das im C-Terminus von PC2L1 gelegene EF-Hand-Motiv keinerlei Bedeutung für die basale Kanalaktivität bzw. die Calcium-induzierte Aktivierung/Inaktivierung hat (Li et al., 2002b). Mutationsformen von PC2L1, die sich trotz fehlender EF-Hand nicht in den charakteristischen Kanaleigenschaften wie Einzelkanalleitfähigkeit und Ionen-Durchlässigkeit vom Wildtyp-Protein unterscheiden, reagieren auf eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration mit einer vergleichsweise höheren Aktivierung. Dies würde für eine modulierende Funktion der EF-Hand hinsichtlich der Kanalfunktion sprechen, die vor einer „Über-Aktivierung“ schützen soll (Li et al., 2002b; Cantiello, 2004). Ganz im Gegensatz dazu stellen folgende Daten einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Entfernen des EF-Hand-Motivs (AS 754-782) und einem damit verbundenem Ausbleiben der Kanalaktivierung von Polycystin-2 her. So führt eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration bei einer bei Patienten beschriebenen Mutante von Polycystin-2, die bei Aminosäure 741 endet und damit kein C-terminales EF-Hand-Motiv mehr beinhaltet, zu keiner Steigerung der Kanalaktivität bzw. „Offen-Wahrscheinlichkeit“, obwohl sich das Protein bezüglich Kanalkinetik oder

Einzelkanalleitfähigkeit nicht vom Wildtyp-Kanal unterscheidet (Vassilev et al., 2001). Auch bei einer Mutante, die bereits bei Aminosäure 703 endet und per se noch als Kanal funktioniert, wird kein Effekt von intrazellulärem Calcium auf die „Offen-Wahrscheinlichkeit“ beobachtet (Koulen et al., 2002).

Die Kanalfunktion von PC2 soll weiterhin durch den Organisationszustand des Mikrotubulsystems beeinflusst werden. So führte die Zugabe von KIF3A (vgl. auch 1.6), einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, zu einer Membranpräparation von hST-Vesikeln (humaner Synzytiotrophoblast, Plazenta), zu einer Aktivitätssteigerung von endogenem Polycystin-2 (Li et al., 2006; Montalbetti et al., 2007). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei Zugabe des Aktin-bindenden Proteins α -Actinin beobachtet (Li et al., 2005a). Ein weiterer für die Kanalfunktion von Polycystin-2 wichtiger Aminosäurebereich scheint in Transmembrandomäne 3 zu liegen. So erwies sich eine bei Patienten vorkommende ADPKD-Missense-Mutante (D511V) von Polycystin-2, die wie das Wildtyp-Protein immer noch eine ER-Lokalisation in der Nieren-Zelllinie LLC-PK₁ zeigt und in vergleichbaren Mengen wie dieses exprimiert wird (beide Proteine wurden heterolog synthetisiert), als völlig funktionslos (Koulen et al., 2002). Außerdem wird eine Inhibierung der Kanalaktivität von Polycystin-2 beobachtet, wenn ein gegen die letzten 259, C-terminalen Aminosäuren (AS 710-968) des Proteins gerichteter Antikörper in die Cis-Seite der Messkammer bei Patch clamp-Experimenten von PC2 synthetisierenden Sf9-Zellen (Insekten-Zellen) gegeben wird (González-Perrett et al., 2001).

1.5 Die subzelluläre Lokalisation von Polycystin-2

1.5.1 Die ER- bzw. Plasmamembran-Lokalisation von Polycystin-2 wird kontrovers diskutiert

Behandelt man Membran-Fractionen von HEK 293-Zellen (humane, embryonale Nieren-Zellen), die endogenes bzw. exogenes Polycystin-2 synthetisieren, mit Endoglycosidase H, einem Enzym, das N-Glykane vom „Mannose-reichen und Hybrid-Typ“, nicht jedoch Strukturen vom komplexen Typ spalten kann (Lottspeich und Zorbas, 1998; Rothman und Fine, 1980), so erweisen sich sowohl das endogene als auch das heterolog produzierte Protein als vollständig sensitiv gegenüber dem Enzym (Cai et al. 1999). Biochemisch gesehen sagt dieser Befund aus, dass Polycystin-2 vornehmlich im ER lokalisiert ist und maximal bis zum

Cis-Golgi-Apparat gelangt sein kann, da Membranproteine im Golgi-Apparat gewöhnlich einer posttranslationalen Modifizierung von Zuckerresten unterzogen werden, die zur sogenannten Endoglykosidase H-Resistenz führt (Rothman and Fine, 1980). Weiterhin konnte durch indirekte Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass Nieren-Zellen wie LLC-PK₁ und HEK 293 (Mensch) bzw. Karzinom-Zellen wie HeLa (Mensch) im Falle einer Überexpression von PKD2 (cDNA) eine retikuläre Anfärbung des Zytoplasmas aufweisen (Cai et al., 1999; Cedzich, 2000; Hidaka et al., 2004), wobei das heterolog produzierte Protein mit einem ER-Marker wie der Protein Disulfid Isomerase (PDI) kolokalisierte (Cai et al., 1999; Cedzich, 2000). Ein weiterer Beweis für die Kolokalisation von Polycystin-2 mit Proteinmarkern des endoplasmatischen Reticulums wurde auch durch Dichte-Gradientenzentrifugationsexperimente von stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen erbracht. So war exogenes Polycystin-2 eindeutig in der ER-Fraktion nachzuweisen und erwies sich zudem als komplett sensitiv gegenüber Endoglykosidase H (Koulen et al., 2002). Biotinylierungs-Experimente mit LLC-PK₁-Zellen, die stabil bzw. transient mit der PKD2 cDNA transfiziert wurden, zeigten, dass exogenes Polycystin-2 nach der Markierung mit Biotin nicht mit Streptavidin aus dem Lysat zu präzipitieren war (Cai et al., 1999). Dies spricht ebenfalls dafür, dass das Protein intrazellulär zurückgehalten wird und nicht zur Plasmamembran gelangt. Eine weitere Zelllinie, bei der endogenes sowie heterolog synthetisiertes Polycystin-2 im ER lokalisiert werden konnte, ist die Ovarial-Zelllinie CHO aus Hamster (Hanaoka et al., 2000; Chen et al., 2001).

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde exogenes Polycystin-2 immunzytochemisch im endoplasmatischen Reticulum von Nieren-Zellen wie LLC-PK₁ oder COS-7 (grüne Meerkatze; vgl. auch 2.1.9.B) nachgewiesen (vgl. auch Cedzich, 2000). Eine Erklärung für die vornehmliche Präsenz von Polycystin-2 im ER sehen Cai et al. (1999) in dem Aminosäurebereich 787-820 im zytoplasmatisch vermuteten C-Terminus des Proteins (Mochizuki et al., 1996), der als Retentionssignal für das endoplasmatische Reticulum fungieren soll. So konnten Polycystin-2-Konstrukte, die bei Aminosäure 703, 741 bzw. 786 enden, an der Plasmamembran von Nieren-Zellen wie LLC-PK₁ bzw. COS M6 (grüne Meerkatze) nachgewiesen werden (Cai et al. 1999; Köttgen et al., 2005). Die Phosphorylierung eines Serin-Restes (AS 812) durch Casein Kinase 2 (CK2) in diesem Retentionssignal soll dabei maßgeblich für die vornehmliche Lokalisation von Polycystin-2 im endoplasmatischen Reticulum verantwortlich sein, da diese Phosphorylierung die Wechselwirkung des Transmembranproteins mit Proteinen wie PACS-1 oder PACS-2

(„phosphofurin acidic cluster sorting proteins“) verstärkt (Köttgen et al., 2005). PACS-1 ist durch Interaktionen mit AP-1 und AP-3 Hüll-Komplexen für die Rückführung von Proteinen aus Endosomen zum Golgi-Apparat verantwortlich (Thomas, 2002). PACS-2 hingegen ist durch die Interaktion mit dem COPI-Hüll-Komplex für die Rückführung von Proteinen vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Reticulum zuständig (Simmen et al., 2005). Immunzytochemische Studien und FACS-Analysen von transient transfizierten COS M6-Zellen ergaben, dass eine Mutationsform von Polycystin-2 mit einem Alanin-Rest an Position 812 im Gegensatz zum Wildtyp-Protein zur Plasmamembran transportiert wird (Köttgen et al., 2005). Daher wird postuliert, dass Polycystin-2 im phosphorylierten Zustand durch Interaktion mit PACS-2 beziehungsweise PACS-1 im endoplasmatischen Reticulum beziehungsweise Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zurückgehalten wird und erst durch die Inhibierung der Casein Kinase 2 oder die Abwesenheit von PACS-1 und PACS-2 zur Plasmamembran gelangt (Köttgen et al., 2005). Hierbei sollte jedoch erwähnt werden, dass in der genannten Publikation kein Nachweis darüber erbracht werden konnte, dass (exogenes) Polycystin-2 bis zum TGN gelangen kann. Was die Phosphorylierung von Polycystin-2 an S812 durch die Casein Kinase 2 betrifft, so konnten diese Daten durch Cai et al. (2004) bestätigt werden, nicht jedoch die Befunde über die Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von exogenem PC2 vom Phosphorylierungszustand dieser Aminosäure. Dies könnte eventuell auf die Verwendung verschiedener Zelllinien durch beide Gruppen begründet sein.

Neben der Phosphorylierung im C-Terminus soll auch ein N-terminales Phosphorylierungsereignis die intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-2 beeinflussen. So wurde nachgewiesen, dass die beiden N-terminalen Serin-Reste 76 und 80 zu einer höchst konservierten Erkennungssequenz der Glykogen Synthase Kinase (GSK3) gehören. Blockiert man diese Kinase in Nieren-Zelllinien wie MDCK (Hund) und mIMCD3, so sinkt der mit ungefähr 10% ermittelte Anteil an plasmamembranständigem, endogenem Polycystin-2 auf circa 1,5% ab, ein Befund, der durch Biotinylierungs- und immunzytochemische Experimente erhoben wurde (Streets et al., 2006). Die Plasmamembranlokalisation von endogenem Polycystin-2 in MDCK-Zellen konnte durch Scheffers et al. (2002) bestätigt werden. Daneben haben auch noch weitere Labore endogenes sowie heterolog produziertes Polycystin-2 in der Plasmamembran nachgewiesen und stehen damit im Widerspruch zu der bisher präsentierten Lokalisation von Polycystin-2 im endoplasmatischen Reticulum. So zeigten Biotinylierungs-Experimente mit MDCK- und mIMCD-Zellen, dass neben endogenem PC2 auch heterolog

synthetisiertes PC2 zur Plasmamembran gelangen kann (Luo et al., 2003). Auch Patch clamp-Versuche konnten die Lokalisation von exogenem Polycystin-2 in der Plasmamembran von mIMCD-Zellen bestätigen (Luo et al., 2003). Letztere Versuchstechnik sowie immunzytochemische Studien ergaben in *Xenopus* Oozyten eine Plasmamembranlokalisation für heterologes Polycystin-2, die durch Zugabe von Proteasom-Inhibitoren und Chaperonen noch gesteigert werden konnte (Vassilev et al., 2001). In der Insekten-Zelllinie Sf9 produziertes Polycystin-2 konnte über Patch clamping ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert werden (González-Perrett et al., 2001). Weitere Zelllinien, bei denen endogenes Polycystin-2 in der Plasmamembran detektiert wurde, sind die Brustdrüsen-Zelllinie EpH4 [Maus] und die Karzinom-Zelllinie HCT8/E8 [Mensch] (Scheffers et al., 2002).

Die im Zellsystem zu beobachtenden Unterschiede sind letztlich auch *in vivo* zu sehen. So ist endogenes Polycystin-2 in adulten Nieren vornehmlich im endoplasmatischen Reticulum bzw. in einem intrazellulären, basalen Kompartiment lokalisiert. Behandelt man Membran-Fractionen von humanem Nierengewebe mit Endoglykosidase H, so erweist sich Polycystin-2 als komplett sensitiv gegenüber dem Enzym, was für eine Lokalisation des Proteins im endoplasmatischen Reticulum spricht (Cai et al., 1999). Dies wird durch Gradientenzentrifugationsexperimente von Nierengewebe aus der Maus unterstützt, bei denen das Protein in den gleichen Fractionen wie das endoplasmatische Reticulum zu finden ist (Koulen et al., 2002). Diese Befunde korrelieren mit immunhistochemischen Daten, die belegen, dass PC2 in Ratten-, Maus- und humanen Nieren in einem basalen Kompartiment von distalen Tubulus-Zellen zu finden ist (Obermüller et al., 1999; Ong et al., 1999; Obermüller et al., 2002). Bei fetalen Nieren scheint Polycystin-2 jedoch zum Teil auch an der Plasmamembran lokalisiert zu sein. So wurde das Protein zwischen der 14. und 17. Entwicklungswoche immunhistochemisch eindeutig in der apikalen sowie der basalen Plasmamembran von medullären Sammelrohren nachgewiesen (Ong et al., 1999). In anderen Organen, wie z.B. der Plazenta, konnte Polycystin-2 an der apikalen Membran des Bürstensaumes von humanen Synzytiotrophoblasten lokalisiert werden (González-Perrett et al., 2001). In menschlichen Parotis- und Submandibulardrüsen ist PC2 neben einem basalen Kompartiment auch an den lateralen Zellgrenzen zu sehen (Obermüller et al., 1999).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen von Polycystin-2 wird in den unterschiedlichen Proteinpools der verschiedenen Zelllinien und Gewebetypen, bzw. in

den unterschiedlichen zellulären Proteinpools zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten gesehen.

1.5.2 Die Lokalisation von Polycystin-2 im Zilium

Trotz der unter 1.5.1 erläuterten, zum Teil widersprüchlichen Daten bezüglich der subzellulären Lokalisation von Polycystin-2 ist die Lokalisation des endogenen sowie exogenen Membranproteins in der Zilienmembran von epithelialen Nierenzellen wie MDCK, LLC-PK₁ oder HEK 293 allgemein bestätigt und anerkannt (Cai et al., 1999; Hidaka et al., 2004; Köttgen et al., 2005; Streets et al., 2006; Gallagher et al., 2006). Auch in Nierengewebe kolokalisierte Polycystin-2 mit acetyliertem Tubulin, einem Marker für Zilien (Yoder et al., 2002; Gallagher et al., 2006). Neben dem Wildtyp-Protein scheinen auch (heterolog synthetisierte) C-terminal abgeschnittene Mutationsformen von Polycystin-2 (vgl. 1.5.1) wie PC2(1/703) oder PC2(1/741) ins Zilium gelangen zu können, ein Befund, der auch in unserer Arbeitsgruppe in LLC-PK₁-Zellen nachvollzogen werden konnte (vgl. auch Hidaka et al., 2004). Dies legt nahe, dass der C-Terminus und damit assoziierte Interaktionspartner nicht am Transport des Proteins in das Zilium beteiligt sein können (vgl. auch Geng et al., 2006). Dies wird durch den Befund bestätigt, dass für die Lokalisation des Proteins im Zilium von LLC-PK₁-Zellen ausschließlich ein RVxP-Motiv in den ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus verantwortlich sein soll (Geng et al., 2006). So reicht die Präsenz dieses Signalmotivs aus, um ein rein auf das endoplasmatische Reticulum beschränktes Protein wie PC2L1 in die Membran von Zilien zu integrieren (Geng et al., 2006). Auch haben die Phosphorylierungen im N- und C-Terminus von Polycystin-2 nachweislich keinerlei Einfluss auf die Zilienlokalisierung des endogenen und exogenen Proteins (vgl. 1.5.1; Cai et al., 2004; Köttgen et al., 2005; Streets et al., 2006). Neben Polycystin-2 konnte auch Polycystin-1 (PC1) im Zilium nachgewiesen werden (Yoder et al., 2002; Nauli et al., 2003).

A. Zilien

Bei Zilien handelt es sich um dünne apikale Zellfortsätze, die sich aus der Mutterzentriole entwickeln, mit der sie fest verbunden bleiben. Sie sind von einer Membran umgeben, die kontinuierlich in die Plasmamembran der Zelle übergeht (Praetorius and Spring, 2004). Beim Basalkörperchen handelt es sich um eine zweigeteilte Struktur (vgl. Abb. 2), bestehend aus 9 Mikrotubuli-Triplets und den „Übergangs-Fasern“, die als sog. „alar shields“ den ganzen

Komplex mit der Plasmamembran stabil verbinden (Praetorius and Spring, 2004; Jensen et al., 2004). Mit einem Durchmesser von ungefähr $0,2\ \mu\text{m}$ (Andrews and Porter, 1974) erreichen Zilien *in vivo* $2\text{--}3\ \mu\text{m}$, in Kultur sogar bis zu $30\ \mu\text{m}$ Länge (Wheatley and Bowser, 2000). Zilien kommen in fast allen Vertebraten-Zellen vor, wobei in der Säuger-Niere nur nicht motile primäre Zilien (vgl. Abb. 2) in der Bowman-Kapsel, dem proximalen und distalen Tubulus sowie den Hauptzellen des Sammelrohrs (Schaltzellen tragen keine Zilien) detektiert wurden (Webber and Lee, 1975). Bei nicht motilen primären Zilien handelt es sich um Zilien mit einem Achsenskelett aus 9 peripheren „Mikrotubuli-Paaren (A und B), die sich von beweglichen Zilien durch die Abwesenheit eines zentralen Tubulus-Paares, der Radspeichenstruktur, den „Dynein-Motoren“ sowie deren regulativen, ATPase-aktiven Proteinen unterscheiden (Praetorius and Spring, 2004).

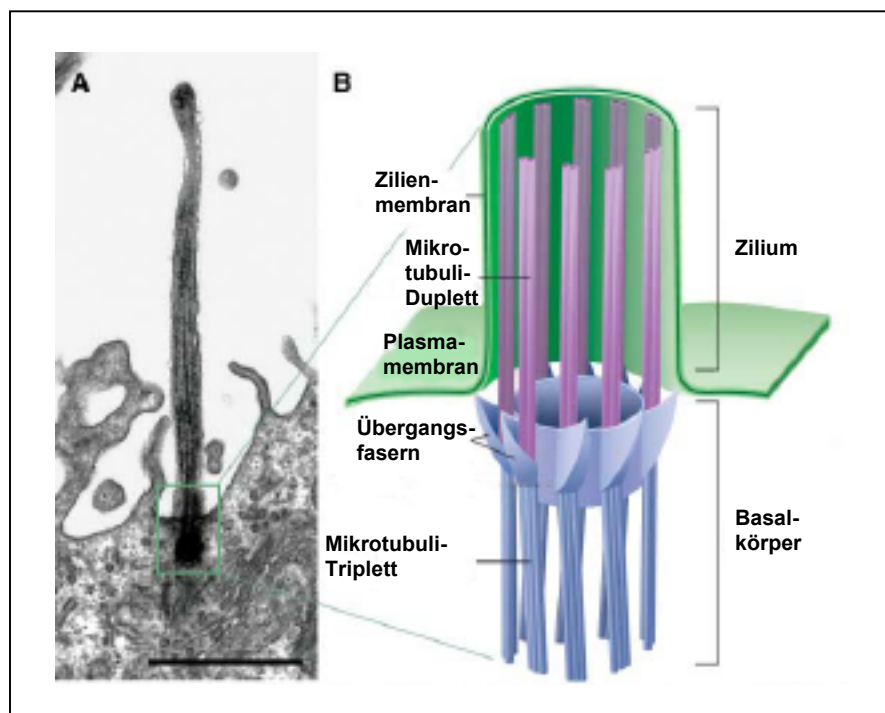


Abb. 2: Struktur eines primären Ziliums (Singla und Reiter, 2006). A: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gliazelle aus dem Gehirn eines Kanarienvogels; Messbalken entspricht einer Länge von $1\ \mu\text{m}$. B: schematische Struktur des Basalkörpers und des primären Ziliums

B. Zilien haben eine mechanosensorische Funktion

Da primäre Zilien, oft in direkter Nachbarschaft zum Zellkern, vom Zentrosom ausgehend, in den extrazellulären Raum ragen, wurde recht früh eine sensorische Funktion von Zilien zum Beispiel im Hinblick auf die Informationsübermittlung von mechanischen Kräften postuliert (Poole et al., 1985; Roth et al., 1988). So konnte gezeigt werden, dass primäre Zilien von epithelialen Nieren-Zellen wie PtK₁ (Ratten-Känguruh) bei Applikation eines

Flüssigkeitsstromes, vergleichbar mit dem in Nierentubuli (10-15 nl/sec oder 15-75 $\mu\text{M}/\text{sec}$) infolge der auftretenden Scherkäfte reversibel gebeugt werden (Schwartz et al., 1997). Der Hinweis auf eine mechanosensorische Funktion von primären Zilien wurde durch den Nachweis erbracht, dass primäre Zilien tragende MDCK-Zellen auf ein Biegen des Ziliums durch Flüssigkeitsstrom (8 $\mu\text{l}/\text{sec}$) oder Ansaugen mittels einer Mikropipette mit einer Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels um das 1,6-1,74-fache reagieren (Praetorius and Spring, 2001). Ein solcher Calcium-Einstrom ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf ~ 300 nM erhöht) infolge eines Flüssigkeitsstroms (0,75 dyne/cm^2) wurde auch bei embryonalen Maus-Sammelrohr-Zellen beobachtet, in deren primären Zilien sowohl Polycystin-1 (mPC1) als auch Polycystin-2 (mPC2) nachgewiesen wurden (Nauli et al., 2003). Gibt man aber gegen die extrazelluläre N-terminale Domäne von mPC1, beziehungsweise die fünfte Schleifenregion von mPC2 gerichtete Antikörper auf die genannten Zellen, so bleibt die mechanisch induzierte Calcium-Antwort aus. Da sich dieses Phänomen auch bei embryonalen Maus-Sammelrohr-Zellen mit einem inaktiven Polycystin-1 Protein (*Pkd1*^{del34/del34}) zeigt, wird vermutet, dass Polycystin-1 und Polycystin-2 einen funktionellen Komplex bilden, der einen mechanischen Stimulus in einen Calcium-Influx übersetzt (Nauli et al., 2003).

Maus-Modelle für die autosomal-rezessiv vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) stellen einen Zusammenhang zwischen Ziliendefekten und ADPKD her. So zeigen die sog. *orpk*-Mäuse mit einer Mutation in dem für Polaris (*Tg737*) kodierenden Gen neben dem typischen PKD-Phänotyp auch verkürzte Zilien (Pazour et al., 2000; Pazour et al., 2002). In den Mausmutanten für Inversin (*inv*) und Cystin (*cpk*) sind zwar keine strukturellen Ziliendefekte zu sehen, der situs inversus-Befund bei dem Inversin-Modell lässt jedoch auf funktionslose Zilien (Dyneindefekt) am Primitivknoten schließen (Hou et al., 2002; Morgan et al., 2002; Ong and Wheatley, 2003). Die Tatsache, dass alle drei Proteine sowie Polycystin-1 und Polycystin-2 im Zilium zu finden sind (Hou et al., 2002; Yoder et al., 2002), führt daher im Hinblick auf den PKD-Phänotyp, der bei Mutationen in den Genen für die genannten Proteine zu beobachten ist, zu der Hypothese, dass die Proteine am selben Proteinkomplex oder Signaltransduktionsweg beteiligt sind, bzw. dass strukturelle oder funktionelle Ziliendefekte die polyzystische Nierenerkrankung auslösen können.

1.6 Bindepertner von Polycystin-2

Mittlerweile sind 15 Bindungspartner für Polycystin-2 identifiziert worden, von denen die meisten ausschließlich bzw. zum Teil mit dem C-Terminus von PC2 wechselwirken (vgl. Tab. 1).

Bindungspartner	Bindungsposition in Polycystin-2	Literaturquelle
α -Actinin	AS 1-215 (N-Terminus) und AS 821-878 (C-Terminus)	Li et al., 2005b
Id2	AS 741-968	Li et al., 2005a
CD2AP	AS 836-968	Lehtonen et al., 2000
Hax-1	Schleifenregion 5	Gallagher et al., 2000
IP ₃ R	AS 680-872	Li et al., 2005c
KIF3B	AS 1-215 (N-Terminus) und AS 682-968 (C-Terminus)	Wu et al., 2006
KIF3A	AS 872-927	Li et al., 2006
TRPC1	TM-Bereich 2-5 und AS 822-895	Tsiokas et al., 1999
Tropomyosin-1	AS 821-878	Li et al., 2003a
Troponin I	AS 872-927	Li et al., 2003b
mDia1	AS 851-969	Rundle et al., 2004
PACS-1 und PACS-2	AS 741-871: saurer Cluster des ER-Retentionssignals	Köttgen et al., 2005
PIGEA-14	AS 833-923	Hidaka et al., 2004
Polycystin-1	AS 687-968 bzw. 742-968	Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997
Polycystin-2	AS 687-968 bzw. 742-871	Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997; Gallagher et al., 2006

Tab. 1: Übersicht der bisher identifizierten Bindungspartner von humanem Polycystin-2 nach Lakkis und Zhou, 2003.

Da im Fokus dieser Arbeit die Wechselwirkung von Polycystin-2 mit Polycystin-1 und PIGEA-14 stand (vgl. rote Umrandung in Tab. 1), soll daher im Folgenden auf diese Interaktionen näher eingegangen werden.

1.6.1 Polycystin-1

Das *PKDI*-Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 16p13.3. und kodiert für ein mehrfach glykosyliertes, 11 Transmembrandomänen umfassendes Protein (4302 Aminosäuren) mit einem Molekulargewicht von ungefähr 460 kDa. Der N-Terminus von Polycystin-1 (PC1) weist zum ER-Lumen bzw. nach extrazellulär, der C-Terminus hingegen reicht ins Zytoplasma (Nims et al., 2003). Nach Abspalten einer charakteristischen Signal-Sequenz im

N-Terminus bilden die ersten mehr als 3000 Aminosäuren einen langen extrazellulären Abschnitt mit strukturellen Domänen (vgl. Abb. 3) wie zum Beispiel zwei Cystein-flankierten, Leucin-reichen Wiederholungen, einem C-Typ Lektin-Motiv, einer 40 Aminosäuren umfassenden, Cystein-reichen LDL-A homologen Domäne sowie 16 Kopien von Immunglobulin-ähnlichen PKD-Domänen, die möglicherweise eine Ligand-bindende Funktion innehaben (Bycroft et al., 1999; Wilson, 2001). Aufgrund der Homologie eines 1000 Aminosäuren langen Abschnittes im N-Terminus von Polycystin-1 (REJ-Domäne) zu dem Seeigel Protein REJ (vgl. Abb. 3), welches bei der Akrosomenreaktion einen Calcium-Influx ins Spermienzytoplasma hervorruft, wird spekuliert, ob Polycystin-1 nicht eventuell eine Rolle beim Calcium-Influx zukommt (Moy et al., 1996; siehe auch 1.5.2). Ein Tyrosin-Rest in einer intrazellulären Schleife zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 und eine SH3-Domäne in der intrazellulären Schleife zwischen Transmembrandomäne 2 und 3 (vgl. Abb. 3) sollen eine Rolle in der Signaltransduktion spielen (Kay et al., 2000; siehe auch 1.5.2). Der 226 Aminosäuren umfassende, intrazelluläre C-Terminus des Proteins besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen wie zum Beispiel 4 Tyrosin-Reste und zwei RSSR-Konsensus-Sequenzen, die durch Protein-Kinase A (PKA) oder Protein-Kinase C (PKC) phosphoryliert werden können (Li et al., 1999). Daneben ist noch eine Prolin-reiche Region (vgl. Abb. 3) zu nennen, die wohl für Protein-Protein Wechselwirkungen wichtig ist (Sudol et al., 1995). Es gibt ebenfalls Hinweise dafür, dass eine proteolytische Erkennungssequenz im C-Terminus vorhanden sein muss, da das C-terminale Ende des Proteins *in vivo* im Zellkern detektiert wurde, ein Befund, der auch dadurch unterstützt wird, dass der C-Terminus einen zu einem bekannten Kernlokalisations-Motiv homologen Bereich aufweist (Chauvet et al., 2004). Vermutlich kann Polycystin-1 so Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene nehmen (siehe auch 1.5.2). Zu guter Letzt besitzt auch PC1 eine Coiled-coil-Domäne (vgl. Abb. 3), die sich aus insgesamt 7 Heptaden (AS 4193-4248) zusammensetzt, wobei die beiden N-terminal gelegenen Heptaden durch 7 Reste von den übrigen 5 Heptaden (AS 4214-4248) getrennt sind (Qian et al., 1997; Wilson, 2001). Diese soll aber im Falle von Polycystin-1 nicht wie bei Polycystin-2 an einer homomeren Interaktion des Proteins beteiligt sein (Tsiokas et al., 1997).

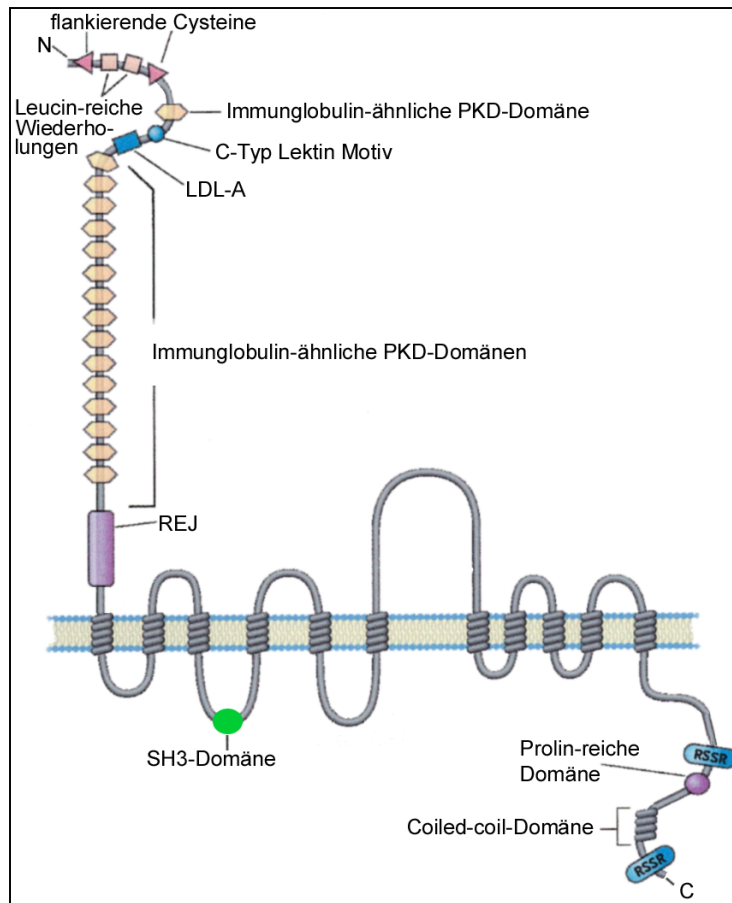


Abb. 3: Struktur-Modell für humanes Polycystin-1 nach Wilson, 2004. Erläuterungen siehe auch 1.6.1.

1.6.2 Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2

Die Tatsache, dass Mutationen im *PKD1*- und *PKD2*-Gen zu vergleichbaren Phänotypen führen, legt nahe, dass beide Proteine Bestandteil desselben Signaltransduktionsweges oder Proteinkomplexes sind, ja sogar direkt miteinander in Wechselwirkung treten können. Der letztere Aspekt konnte 1997 durch 2 unabhängige Publikationen bestätigt werden.

Zwei-Hybrid-Assays in Hefe zeigten, dass die C-terminale Coiled-coil-Domäne von Polycystin-1 für eine Wechselwirkung mit dem C-Terminus von Polycystin-2 völlig ausreichend ist (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). Weitere Studien konnten den nötigen Minimalbereich für die Wechselwirkung mit Polycystin-2 sogar auf die 5 Heptaden (AS 4214-4248) der Coiled-coil-Domäne eingrenzen (Qian et al., 1997). Der für die Wechselwirkung notwendige Aminosäurebereich in Polycystin-2 wurde von Qian et al. (1997) auf die Aminosäuren 687-968 festgelegt, wohingegen Tsiokas et al. (1997) den Bereich auf die Aminosäuren 742-968 eingrenzen konnten. Die Zwei-Hybrid-Daten über die

Wechselwirkung der beiden Transmembranproteine konnten durch Immunpräzipitationsstudien mit *in vitro* translatierten (Qian et al., 1997) oder in HEK 293 Nieren-Zellen produzierten (Tsiokas et al., 1997), C-terminal verkürzten Versionen von Polycystin-1 bzw. Polycystin-2 bestätigt werden, die jeweils mit entsprechenden Epitopmarkierungen vorlagen. Zudem konnten Komplexe aus beiden Proteinen über Immunpräzipitation aus Nieren-Tubulus-Zellen (Maus) wie M7 (exogenes Polycystin-1) und M8 (endogenes Polycystin-1) und aus normalen menschlichen Nieren isoliert werden (Newby et al., 2002).

Im Bezug auf die funktionelle Relevanz einer Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde die Beobachtung gemacht, dass heterolog produziertes Polycystin-2 nur in Anwesenheit von exogenem Polycystin-1 zur Plasmamembran von Hamster-CHO-Zellen transportiert werden kann (Hanaoka et al., 2000). Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass endogenes Polycystin-2 in einer embryonalen Maus-Sammelrohr-Zelllinie ohne funktionelles, endogenes Polycystin-1 (*Pkd1^{del34/del34}*) nicht mehr ins Zilium gelangt (Nauli et al., 2003), ein Befund, der im Widerspruch zu Daten von Geng et al. (2006) steht, die besagen, dass Polycystin-2 ohne die Hilfe von Polycystin-1 ins Zilium gelangen kann (vgl. auch 1.5.2). Neben der Regulierung des intrazellulären Transports von Polycystin-2 soll Polycystin-1 auch die Kanalaktivität von Polycystin-2 steuern. So wurde beobachtet, dass in embryonalen Maus-Sammelrohr-Zellen ohne funktionelles, endogenes Polycystin-1 (s.o.), im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen mit funktionellem, endogenem Polycystin-1 auch kein flussinduzierter Calcium-Influx mehr als Antwort auf eine Zilienbewegung stattfindet. Da die Calcium-Antwort auch ausbleibt, wenn Antikörper gegen Polycystin-1 oder Polycystin-2 zu den normalen embryonalen Maus-Sammelrohr-Zellen gegeben werden, wird postuliert, dass beide Proteine einen funktionellen Komplex bilden. Polycystin-1 soll dabei wie eine Art Antenne für den durch den Flüssigkeitsstrom induzierten Scherstress wirken und diese Information durch die Wechselwirkung mit Polycystin-2 an dieses übertragen, was letztlich zu einem Calcium-Einstrom führt (Nauli et al., 2003). So konnte in Lipidmembran-Experimenten gezeigt werden, dass die Zugabe eines die Coiled-coil Domäne umfassenden C-terminalen Abschnittes von Polycystin-1 zur Erhöhung der Kanalaktivität von rekonstituiertem, *in vitro* translatiertem Polycystin-2 führt (Xu et al., 2003). Die Präsenz beider Proteine soll weiterhin für die Steuerung der folgenden Signalwege erforderlich sein. So scheint Polycystin-2 regulierend in die Aktivierung von G-Proteinen vom sog. G₀/G_i-Typ durch Polycystin-1 einzugreifen (Bhunja et al., 2002). Auch für das Absenken der Proliferationsrate von MDCK-Zellen durch Anschalten des JAK-STAT-Pathways durch PC1 ist die Gegenwart von PC2

erforderlich (Parnell et al., 1998; Delmas et al., 2002). Auch konnte gezeigt werden, dass beide Proteine in der Aktivierung der AP1-abhängigen Gen-Transkription beteiligt sind (Arnould et al., 1998).

1.6.3 PIGEA-14

Das Gen für PIGEA-14 (= polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum associated protein with a molecular weight of 14 kDa) ist auf Chromosom 22q12-13 lokalisiert und ist in 5 Exonen organisiert (Witzgall, 2005). Es kodiert für ein 126 Aminosäuren langes, lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 14 kDa (Hidaka et al., 2004). Im Bereich von Aminosäure 69–109 soll eine Coiled-coil-Domäne liegen.

1.6.4 Interaktion von PIGEA-14 und Polycystin-2

Nach den Daten aus einem Zwei-Hybrid-Assay in Hefe zu urteilen soll die Coiled-coil-Domäne von PIGEA-14 als minimal notwendiger Bereich für die Interaktion mit Polycystin-2 dienen (Hidaka et al., 2004). Bei Polycystin-2 wiederum ist dieser helikale Bereich nicht an der Wechselwirkung mit dem 14 kDa großen Protein beteiligt. So konnte mittels des gleichen Tests gezeigt werden, dass die C-terminalen Aminosäuren 833-923 von Polycystin-2 für die Interaktion ausreichend sind (Hidaka et al., 2004). Immunpräzipitationsversuche mit Epitop-markiertem Wildtyp-Polycystin-2 bzw. PIGEA-14, die in LLC-PK₁-Nieren-Zellen oder HeLa-Karzinom-Zellen produziert wurden, konnten die Hefe-Daten bestätigen (Hidaka et al., 2004). Die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen beiden Proteinen scheint in der Regulierung des Transports von Polycystin-2 durch PIGEA-14 zu liegen. So konnte gezeigt werden, dass PIGEA-14 nicht nur mit Polycystin-2, sondern auch mit dem Cis-Golgi-Markerprotein GM130 wechselwirkt (Hidaka et al., 2004), das wiederum in den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat beteiligt ist (Barr and Short, 2003). Werden Polycystin-2 und PIGEA-14 zusammen in LLC-PK₁- oder HeLa-Zellen (heterolog) synthetisiert, so kommt es zu einer Umverteilung der beiden Proteine in vesikuläre Strukturen, die mit einem Marker für das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN46) kolokalisieren (Hidaka et al., 2004). Da die Färbung gegen das Golgi-Markerprotein bei einer Koexpression beider cDNAs nicht mehr einer typischen Färbung für das Trans-Golgi-Kompartiment entspricht und da Polycystin-2 auch bei Koexpression mit PIGEA-14 immer noch Endo H-

sensitiv ist (Witzgall, 2005), kann daher nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass PC2 tatsächlich vom ER bis zum Trans-Golgi-Netzwerk gelangt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

PKD1 (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994) und *PKD2* (Mochizuki et al., 1996) sind die verantwortlichen Gene für die autosomal dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD). Im Falle von Polycystin-2 ist bekannt, dass dieses als nicht selektiver Kationen-Kanal fungiert (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002). Bisher konnten eine Reihe von Bindungspartnern identifiziert werden, wobei über den funktionellen Zusammenhang und die Regulation dieser Wechselwirkungen zum Teil noch spekuliert wird (vgl. 1.6). Die subzelluläre Lokalisation des Proteins wird sehr kontrovers diskutiert (vgl. auch 1.5) und es ist bisher noch nicht klar, wie Mutationen im *PKD2*-Gen (aber auch im *PKD1*-Gen) zum Ausbruch von ADPKD führen, da bisher noch keine „Hot-spots“ für Mutationen gefunden wurden. Daher bestand die Zielsetzung dieser Arbeit in der strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Polycystin-2. So sollte mit Hilfe von Topologie-Studien zunächst überprüft werden, ob das von Mochizuki et al. (1996) postulierte 6 Transmembrandomänen-Modell zutrifft. Über NMR-Analysen sollte die Struktur der C-terminalen Domäne von Polycystin-2 analysiert werden, da diese zum einen mit fast allen der bisher identifizierten Bindungspartner wechselwirkt (vgl. auch 1.6) und einige interessante funktionelle und strukturelle Elemente enthält (vgl. auch 1.3). Weiterhin sollte eine im Verlauf der Topologie-Studien aufkommende Hypothese auf ein Plasmamembran-Exportmotiv weiter bearbeitet werden, um einen Beitrag zum Verständnis des bisher sehr kontrovers diskutierten intrazellulären Transports zu leisten (vgl. 1.6). Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beinhaltete die Bestimmung von Bindungsparametern für Interaktionen von Polycystin-2 mit Polycystin-1, PIGEA-14 und Calcium mit Hilfe der Quarzmikrowaage-Technik und Fluoreszenzspektroskopie, um so die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkungen besser beurteilen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acido Fixer (Fixierer für Röntgenfilme bei Western-Blots)	Agfa
Aceton	Acros
Acrylamid	Serva
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
¹⁵ N-Ammoniumchlorid (> 99%)	Spectra Stable Isotopes
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad
Ampicillin	Serva
Aprotinin	Roth
Bacto-Agar	Becton Dickinson
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bacto-Trypton	Becton Dickinson
N',N' Methylen Bisacrylamid	Serva
Brefeldin A	Fluka
Bromphenolblau	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck
Borsäure	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indonyl-phosphat (BCIP)	Sigma
Calciumchlorid	Roth
Chloramphenicol	Calbiochem
Chloroquin	Sigma
Coomassie Brilliant Blau G 250	Serva
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva
DEAE-Dextran	Sigma
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
D ₂ O (> 99% ² H)	Spectra Stable Isotopes
¹³ C ₆ -D-Glucose (> 98%)	Spectra Stable Isotopes
Digitonin	Sigma

Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid (> 99%)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/L)	PAA
Doxycyclin	PAA
Eisensulfat	Merck
Entwickler Eukobrom (Entwickler für Röntgenfilme bei Western-Blots)	TETENAL AG &CO. KG
Essigsäure	Merck
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz (EDTA-Na ₂)	Sigma
FBS: fetales Kälberserum	Invitrogen
Ficoll 400	Serva
Formalin	Sigma
G 418 (Neomycin)	PAA
Glukose	Merck
Glutathion, reduzierte Form	Sigma
Glycin	Roth
Glyzerin	Merck
Harnstoff	Merck
Hoechst 332T8 (Bisbenzimid)	Sigma
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfon-Säure (Hepes)	Fluka
Imidazol	Merck
Immersol™ 518F: Immersionsöl zum Mikroskopieren	Carl Zeiss
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumazetat	Merck
Kaliumchlorid	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid-Plätzchen	Merck
Kanamycin	Sigma
Kobalt(II)chlorid	Sigma
Kupferchlorid	Riedel de Haën

Lambda DNA/ <i>Hind III</i> -Marker; Φ X174 DNA/ <i>BsuRI</i> (<i>HaeIII</i>)-Marker	Fermentas
Leupeptin	Roth
Levamisol	Sigma
Lithiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Maltose	Riedel de Haën
Manganchlorid	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumphosphat	Merck
Natronlauge	Merck
Nickelchlorid	Riedel de Haën
Nickelsulfat-6-hydrat	Riedel de Haën
4-Nitro Blau Tetrazolium Chlorid (NBT)	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roth
o-Phosphorsäure 85%	Merck
Pikrinsäure	Sigma
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Sigma
Poly-L-Ornithin	Sigma
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB
Puromycin	PAA
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Sigma
Roti-Phenol/C/I (Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol)	Roth
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid)	Applichem
Roti®Quant	Roth
Salzsäure	Merck
Saccharose	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Tetracyclin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	USB
Triton-X-100	Merck
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	Serva

X-gal	Roth
Xylencyan FF	Serva
Zinksulfat	Merck

2.1.2 Enzyme

Die geeigneten 10 x Puffer und Reaktionszusätze wurden jeweils bei den entsprechenden Firmen mitbestellt.

A. Restriktionsendonukleasen

<i>Afl</i> II: 20 U/ μ l	NEB
<i>Apa</i> I: 50 U/ μ l	NEB
<i>Bam</i> H I: 20 U/ μ l	NEB
<i>Bgl</i> II: 10 U/ μ l	NEB
<i>Bsa</i> A I: 5 U/ μ l	NEB
<i>Bsr</i> G I: 10 U/ μ l	NEB
<i>Cla</i> I: 5 U/ μ l	NEB
<i>Dpn</i> I: 20 U/ μ l	NEB
<i>Eco</i> R I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Eco</i> R V: 20 U/ μ l	NEB
<i>Hind</i> III: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Kpn</i> I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Mlu</i> I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Nde</i> I: 20 U/ μ l	NEB
<i>Not</i> I: 10 U/ μ l	Fermentas und NEB
<i>Pst</i> I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Xba</i> I: 20 U/ μ l	NEB
<i>Xma</i> I: 10 U/ μ l	NEB
<i>Xho</i> I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Sac</i> II: 20 U/ μ l	NEB

B. DNA und RNA modifizierende Enzyme

Klenow DNA Polymerase: 5 U/ μ l	NEB
T 4 DNA Polymerase: 3 U/ μ l	NEB
T4 DNA Ligase: 400 U/ μ l	NEB
BAP (<u>B</u> acterial <u>a</u> lkaline <u>p</u> hosphatase): 150 U/ μ l	Invitrogen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase: 2,5 U/ μ l	Fermentas
RNase A (lyophilisiert) -> 1 μ g/ μ l in H ₂ O lösen	Serva

C. Proteinasen

Proteinase K (lyophilisiert) -> 20 mg/ml in A. bid. lösen	Roth
Biotinyliertes Thrombin: 1 U/ μ l	Novagen
HRV 3C Protease: 2 U/ μ l	Novagen

D. Protein modifizierende Enzyme

Endo H _f : 1000 U/ μ l	NEB
PNGase F: 500 U/ μ l	NEB

2.1.3 Kits

Wizard <i>Plus</i> Midipreps DNA Purification System	Promega
--	---------

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices: 15 ml; 5 MWCO; regenerierte Zellulose	Millipore
Amylose Resin	NEB
Autoklavierband	VWR
Chelex 100 Sodium form	Sigma
Chromatographie Papier „3MM Chr“	Whatman

Chromatographie-Säulen (Gravitationssäulen aus Plastik)	Novagen
Deckgläschen aus Glas: 12 mm Durchmesser (rund)	VWR
Deckgläschen aus Glas: 24 x 60 cm	Roth
Dialyse-Schlauch 12.000-14.000 MWCO; Glycerin-haltig; regenerierte Zellulose	Medicell International
Dialyse-Schlauch-Klammern (orange)	Roth
Einfrierröhrchen	Nunc
Elutip-Säulchen	Schleicher & Schüll
EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce (Perbio)
Falcon-Tubes: 50 ml und 15 ml (Plastik)	Sarstedt
Film-Kassetten: Universal 100 (35,6 x 43,2 cm) mit Verstärkerfolie und blau emittierend EK 100 (für Röntgenfilme bei der Entwicklung von Western-Blots)	rego
Flottierhilfe für Slide-A-Lyzer (weiß)	Pierce (Perbio)
Glasobjektträger (76 x 26 cm)	R. Langenbrinck
Glaswaren/Plastikwaren: Flaschen, Kulturkolben etc.	Roth
Glogos Autorad Marker	Stratagene
Handschuhe Latex	Kimberley-Clark
Handschuhe Nitril	Roth
Haushaltstücher	Fripa
His Bind Resin	Novagen
Immobilized NeutrAvidin™ Protein	Pierce (Perbio)
Kanülen: 21 G x ½	Braun
Klarsichtfolien (klar)	Leitz/Durable
Kosmetik-Tücher	Kimberley-Clark
Küvetten (Plastik) für Electroporator 2510: E.coli@PulserCuvette	Biorad
Küvetten 100 (Plastik) (10 x 4 x 45 mm) für Spektralphotometer „U-2000“; 1 ml (Proteinbestimmung und OD-Messungen)	Sarstedt
MF-Millipore Membranfilter: 0,025 µm	Roth
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas: 0,100 mm Tiefe/ 0,0025 mm ²	BRAND
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt/ Gilson
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare
PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße Immobilon-P Transfermembran	Millipore
Reaktionsgefäße aus Plastik: 0,2 ml / 0,5 ml / 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße aus Polyallomer 1,5 ml: Microfuge®Tube	Beckmann Coulter GmbH

Röntgenfilme: Fuji Medical X-Ray FILM 100 NIF	gfh
18 cm x 24 cm und 35 cm x 43 cm	
Serologische Pipetten	Sarstedt
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten: Glycerin-frei	Pierce (Perbio)
100-500 µl / 1-3 ml / 3-12 ml; regenerierte Zellulose; 3,5 MWCO	
Spritzen (steril)	Braun
Sterilfilter (0,22 µm)	VWR
Streptavidin Agarose	Novagen
VIVASPIN 2; 2 ml; PES; 5 MWCO: Proteinkonzentratoren für Zentrifugen	VIVASCIENCE
Western Lightning Chemoluminescence Reagent	Perkin Elmer
Zellkulturbedarf: T75- und T25-Filterflaschen; P10-, P6- und P3-Schalen; 24-Loch-, 6-Loch- und 96-Loch-Platten	Sarstedt
Zell-Schaber	Sarstedt
Zentrifugenbecher aus Plastik für Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ (20 ml)	Beckman Coulter GmbH
Zentrifugenbecher aus Plastik mit Schraubverschluss (250 ml) für Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC2-B“ mit Rotor GSA	Beckman Coulter GmbH

2.1.5 Geräte

Autoklav „Systec 5050 ELV“	Systec
Autoklav Vakuklav® 30-B	Mela
Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationsystem „Gel Max“	Intas
Agarose-Gelelektrophorese Midisystem „Easy cast“	Owl Scientific
Agarose-Gelelektrophorese Minisystem „Horizon 58“	GIBCO BRL
CMV-E: Dreharm für Eppendorf-Cups	Fröbel Labortechnik GmbH
Drehrad für Eppendorf-Cups	Werkstatt der Univ. Rgbg. für NWF III
DMC 2-Kamera (für Fluoreszenzmikroskop-Axioskop)	Polaroid
Eismaschine AF-10	Scotsman
Electroporator 2510	Eppendorf
Feinwaage „Mettler H10w“	Mettler
Flüssigstickstofftank: ARPEGE TP 100	Air Liquide
Fluoreszenzmikroskop: Axioskop 20	Carl Zeiss
Fluorescence Spektrophotometer CARY ECLIPSE mit	Varian
Temp. Controller	
Gefrierschränke bis -20°C	Privileg

Gefrierschränke bis -80°C „Herafreeze“	Heraeus
Heizblock „VLM LS 1“	VLM
Heizplatten mit Magnetrührer „MR 3001“	Heidolph
Inkubationsschrank „Kelvitron t“	Heraeus
Inkubationsschüttler „Unitron“	Infors
Konfokalmikroskop: LSM 510 Meta	Carl Zeiss
Kühlschränke	Privileg
Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454	Heraeus
Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154 oder 12158	Braun
Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC2-B“ mit Rotor GSA	Sorvall
„Mastercyler Gradient“	Eppendorf
Mikroskop: Nikon Eclipse TS 100	Nikon
Mikrowelle „Privileg 8018 E“	Privileg
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick
Quarküvette: QS 1.000 mit passendem Magnetfisch für Fluorescence Spektrophotometer CARY ECLIPSE; 1 ml	Hellma
Quarküvette QS 1.000 (schwarz; 100 μl , Schichtdicke und Zentrum jeweils 10 mm) für Spektralphotometer „U-2000“ (für DNA- und Proteinbestimmung)	Hellma
Scanner DUOSCAN f40	Agfa
Schüttler für SDS-Gele und Western-Blot-Membranen	Oehmen Labortechnik
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System „SE 600 Series Elektrophoresis Unit“ (14 cm x 12 cm x 1,5 mm)	Hoefer
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System (8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm): Mini Protean® II Elektrophoresis Cell	Biorad
Spannungsgeber “PS 608 Electrophoresis Power Supply”	GIBCO BRL
Spannungsgeber “Standard Power Pack P25”	Biometra
Spektralphotometer „U-2000“	Hitachi
Thermomixer 5436 für Eppendorf-Cups	Eppendorf
Thermocycler-Cycler „My Cycler“	Biorad
Thermostat “Polystat cc1”	Huber
Tischzentrifuge “Biofuge pico” mit Rotor Sorvall 3329	Heraeus
Ultraschallgerät „Vibra Cell“	Sonics & Materials Inc.
Ultrazentrifuge: Optima™MAX-E mit Rotor TLA-55; 100.000 RPM	Beckman Coulter GmbH

Vortexer "Vortex-Genie 2"	Scientific Industries
Waage „BL 1500 S“	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage "Seralpur PRO 90 CN"	Seral
Western-Transferkammer „TE 62“ (Tank-Blotting)	Hoefer
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Biorad
Zell-Homogenisator mit jeweiligen Teflon-Stäben und passenden Glas-Reaktionsgefäßen: RW 14 H (IKA-WERK)	JANKE & KUNKEL GmbH und Co KG
Zellkulturarbeitsbank: Heraeus Lamin Air HA 2448 GS	Heraeus
Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB	Binder

2.1.6 Software

A. Programme

Adobe Photoshop	digitale Bildbearbeitung
File Maker Pro 6	institutseigene Datenbanken
Microsoft Excel	Diagramme, Berechnungen und Tabellen
Sigma Plot 9.0	Verwendung beim Erstellen bzw. „Fitten“ von Bindungskurven (siehe 2.2.4.J)
Microsoft Word	Textverarbeitung
Primer Express 2.0	Errechnung von Schmelz-Temperaturen bei der Konzipierung von Primern
Cary Eclipse	Messprogramm für Fluorescence Spektrophotometer CARY ECLIPSE mit Temp. Controller (siehe 2.2.4.J)
Zeiss LSM	Bildaufnahme-Programm am vom LSM 510 Meta
Zeiss LSM Image Browser	Anzeige-Programm von Konfokalbildern vom LSM 510 Meta (siehe 2.2.2.K)
Image Pro Express	Bildaufnahme-Programm am Fluoreszenzmikroskop Axioskop 200(M) mit DMC 2-Kamera (siehe 2.2.2.K)

B. Internetdatenbanken

NCBI	a) Quelle für cDNA-, mRNA- sowie Aminosäuresequenzen b) Vergleich von 2 DNA-Sequenzen
Pubmed	Literaturrecherche
Swissprot	a) Quelle für Aminosäuresequenzen b) Quelle für Charakterisierung von Proteinen bezüglich Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt
Porter Protein Secondary Structure Prediction at University College Dublin (Gianluca Pollastri, AmBio group, School of Computer Science and Informatics)	Sekundärstrukturvorhersage für Proteine

2.1.7 Antikörper

A. Primärantikörper

Name	Immunogen/Epitop	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Quelle
12CA5 (H26D08)	YPYDVPDYA-Sequenz von Influenza Hämagglutinin Protein (HA) in Fusionsproteinen z.B. aus Säuger-Zellen	Maus, monoklonal	1:30 1:30 1:1	IC WB IP	Hybridomzelllinie von J. Kyriakis (Field et al., 1983)
anti-HA	YPYDVPDYA-Sequenz von Influenza Hämagglutinin Protein (HA) in Fusionsproteinen z.B. aus Säuger-Zellen	Kaninchen, polyklonal	1:100	IC	Sigma
anti-HA high affinity 3F10	YPYDVPDYA- Sequenz von Influenza Hämagglutinin Protein (HA) in Fusionsproteinen z.B. aus Säuger-Zellen	Ratte, monoklonal	1:4000	WB	Roche
anti-Calnexin	AS 116-301 von humanem Calnexin	Maus, monoklonal	1:30	IC	BD Biosciences
anti-Calreticulin	AS 405-417 aus humanem Calreticulin	Kaninchen, polyklonal	1:2000	WB	Stressgen
anti-azetyliertes Tubulin (6-11B-1)	acetyl. Tubulin des äußeren Armes von <i>Strogylocentrotus purpuratus</i>	Maus, monoklonal	1:200	IC	Sigma
GM130	AS 869-982 von GM130 (aus Triton-unlöslicher Golgi-Matrix) aus Ratten-Hirn	Maus, monoklonal	1:600	IC	BD Transduction Laboratories

anti Giantin	isolierte Golgi-Membranen aus humaner Intestinal-Zelllinie Caco-2	Maus, monoklonal	1:1000	IC	H.P. Hauri (Linstedt und Hauri, 1993)
anti-Polycystin-2 (Mu 50), Präimmunserum	aufgereinigtes, rekomb. Peptid (AS 331-343) von humanem Polycystin-2 (im Bereich der 1. Schleifenregion)	Kaninchen, polyklonal	1:100	IC	Institutsintern
anti-Polycystin-2 (Mu 12), Präimmunserum	aufgereinigtes, rekomb. Peptid (AS 349-361) von humanem Polycystin-2 (im Bereich der 1. Schleifenregion)	Kaninchen, polyklonal	1:2000	WB	Institutsintern
anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α 1-subunit (M8-P1-A3)	aufgereinigte α 1-Untereinheit der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase aus Lamm-Niere (AS 496-506)	Maus, monoklonal	1:3000	WB	Sigma
OKT 8	CD8 auf T-Lymphozyten (zytotoxisch bzw. suppressor)	Maus, monoklonal	1:30	IC	Hybridomzelllinie (von W. Nickel, ZMBH Heidelberg)
anti-poly-Histidine (HIS-1)	aufgereinigtes, rekomb. His-markiertes Fusionsprotein; Erkennung von nativen sowie denaturiert-reduzierten Formen von synthetischen Polyhistidinen oder Polyhistidin-markierten Fusionsproteinen (z.B. pET-Vektoren): bevorzugte Erkennung von N-terminalen His-Epitopen	Maus, monoklonal	1:1000	WB	Sigma
anti-PIGEA14 119/01, Kaninchenserum G8HK vom 25.09.01	aufgereinigtes, rekomb. (AS 1-126) humanes PIGEA-14 (=CIP1)-Protein	Kaninchen, polyklonal	1:3000	WB	Institutsintern
anti-PC2 (YCB9)	aufgereinigtes rekomb. Peptid (AS 103-203) im N-terminalen Bereich von humanem Polycystin-2	Kaninchen, polyklonal	1:4000 1:4000	WB IC	S. Somlo, Yale University, New Haven
anti-PC2 (YCC2)	aufgereinigtes rekomb. Peptid (AS 687-962) im C-terminalen Bereich von humanem Polycystin-2	Kaninchen, polyklonal	1:6000	WB	S. Somlo, Yale University, New Haven
T7-Tag [®]	T7-Epitop-Peptid (Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly) N-terminal, C-terminal und intern	Maus, monoklonal	1:3000	WB	Novagen

Tab. 2: Primärantikörper. Immunzytochemie: IC / Western-Blot: WB / Immunpräzipitation: IP

B. Sekundärantikörper

Name	Immunogen/Epitop	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Quelle
Cy TM ₃ -Ziege-anti-Maus IgG	Erkennung von schweren und leichten Ketten von IgG-Immunglobulinen aus der Maus	Ziege, polyklonal	1:300	IC	Jackson Immuno Research/Dianova
FITC-Ziege-anti-Maus	Erkennung von IgG Immunglobulinen (gesamtes Molekül) aus der Maus	Ziege, polyklonal	1:200	IC	ICN Biomedicals
Cy TM ₃ -Ziege-anti-Kaninchen	Erkennung der schweren und leichten Ketten von IgG-Immunglobulinen aus Kaninchen	Ziege, polyklonal	1: 400	IC	Jackson Immuno Research/Dianova
HRP-Ziege-anti-Maus	Erkennung von IgG-Immunglobulinen (G1,G2a/b und G3) aus der Maus sowie den Fab-Fragmenten von Maus IgG-Immunglobulinen; ebenfalls Erkennung von IgA-, IgM- und IgE-Immunglobulinen aus der Maus	Ziege, polyklonal	1:1 0000	WB	Sigma
HRP-Ziege-anti-Kaninchen	Erkennung von IgG-Immunglobulinen (gesamtes Molekül) aus Kaninchen	Ziege, polyklonal	1:20000	WB	Sigma
HRP-Ziege-anti-Ratte	Erkennung der schweren und leichten Ketten von IgG- und IgM-Immunglobulinen aus der Ratte	Ziege, polyklonal	1:20000	WB	Jackson Immuno Research/Dianova

Tab. 3: Sekundärantikörper. Immunzytochemie: IC / Western-Blot: WB

2.1.8 DNAA Plasmide

Die bp-Angaben entsprechen den unter 2.1.8.B aufgeführten cDNA-Angaben. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.8.C zu finden.

Plasmid-Name	Größe in kbp	Selektion	Beschreibung: alle Angaben in 5'-3'-Richtung der kodierenden Sequenz	Quelle
pET28a	5,4	Kan	enthält T7-Promotor und kodiert für 6 Histidine, Thrombin-Schnittstelle, T7-Tag und 6 Histidine; Ziel-DNA kann je nach gewünschter Epitop-Kombination einkloniert werden, da zwischen jedem genannten Sequenzelement Restriktionsschnittstellen liegen (außer zwischen His-Epitop und Thrombin-Schnittstelle)	Novagen
pET28aΔT7/ PKD2(680-769) ¹	5,7	Kan	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 2104-2373 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 1&2; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I-Schnittstellen in pET28a	diese Arbeit

pET28aΔT7/ PKD2(797-980) ²	5,9	Kan	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 2455-2973 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 3&4; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Nde I/Xho I</i> -Schnittstellen in pET28a	diese Arbeit
pET41a	5,9	Kan	enthält T7-Promotor und kodiert für <u>G</u> lutathion <u>S</u> -Transferase (GST) aus <i>Schistosoma japonicum</i> ; kodiert C-terminal von GST-Sequenz weiterhin für 6 Histidine, Thrombin-Schnittstelle, S-Epitop, Enterokinase-Schnittstelle und 8 Histidine; Ziel-DNA kann je nach gewünschter Epitop- und Protease-Schnittstellen-Kombination einkloniert werden, da zwischen jedem genannten Sequenzelement Restriktionsschnittstellen liegen	Novagen
pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) ³	5,7	Kan	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 2104-2454 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 5&6; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Mun I/Xho I</i> -Schnittstellen in pET41a; Verdau mit <i>Nde I/Sac II</i> ; Einfügen des His-Primerpaares (7&8) in den <i>Nde I/Sac II</i> geschnittenen Vektor	diese Arbeit
pET47b	5,2	Kan	enthält T7-Promotor und kodiert für 6 Histidine, HRV 3C-Schnittstelle, Thrombin-Schnittstelle und S-Epitop; Ziel-DNA kann je nach gewünschter Epitop- und Protease-Schnittstellen-Kombination einkloniert werden, da zwischen jedem genannten Sequenzelement Restriktionsschnittstellen liegen (außer zwischen Thrombin-Schnittstelle und S-Epitop)	Novagen
pET47b/ PKD2(797-980) ⁴	5,7	Kan	Insert (bp-Bereich 2455-2973 von humanem PKD2) entnommen über <i>Nde I</i> -> T4 DNA Polymerase/ <i>Xho I</i> aus pET28aΔT7PKD2C 518bp und einkloniert in <i>Xma I</i> -> T4 DNA Polymerase/ <i>Xho I</i> geschnittenen pET47b	diese Arbeit
pET21b	5,4	Amp	enthält T7-Promotor und kodiert für T7-Tag und 6 Histidine; Ziel-DNA kann je nach gewünschter Epitop-Kombination einkloniert werden, da zwischen jedem genannten Sequenzelement Restriktionsschnittstellen liegen	Novagen
pET21b/PIGEA-14 ⁵	5,8	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 73-450 von humanem PIGEA-14 mittels Primerpaar 9&10; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>EcoR I/Xho I</i> -Schnittstellen in pET21b	S. Hidaka
pET21b/PKD1C	5,7	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 12709-13044 von humanem PKD1 mittels Primerpaar 11&12; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>BamH I/Xho I</i> -Schnittstellen in pET21b	diese Arbeit, mit R. Kapzan
pET21b/CLIM1	5,7	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1018-1338 von CLIM1 mittels Primerpaar 13&14; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>EcoR I/Xho I</i> -Schnittstellen in pET21b	Dr. med. J. Prestel
pMAL-c2	6,6	Amp/ X-gal	enthält <i>tac</i> -Promotor und kodiert für das <u>M</u> altose- <u>b</u> indende <u>P</u> rotein (MBP); Ziel-DNA kann C-terminal von <i>malE</i> -Sequenz einkloniert werden; kodiert für Faktor Xa-Sequenz zwischen <i>malE</i> -Gen und MCS	NEB
pMAL-c2/PKD2C	7,5	Amp/ X-gal	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 2104-2973 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 15&16 (15 enthält HRV 3C-Erkennungssequenz); Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Xba I/Pst I</i> -Schnittstellen in pMAL-c2	diese Arbeit, mit L. Osten
pcDNA3	5,4	Amp	enthält den CMV-Promotor und ein Neomycin-Resistenzgen	Invitrogen
pcDNA3/PKD2 Schleife 1-HA ⁶	6,8	Amp	Insertion einer <i>Afl II</i> -Schnittstelle bei bp 1443-1448 in pcDNA3/PKD2fl-HA (TTTAAA->CTTAAAG) über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 17&18; Verdau mit <i>Afl II</i> und <i>Xho I</i> ; Einfügen eines HA-Primerpaares (19&20) in den <i>Afl II/Xho I</i> geschnittenen Vektor	R. Gallagher
pcDNA3/PKD2 Schleife 1-HA-AP ⁷	8,7	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 232-1698 von humaner alkalischer Phosphatase mittels Primerpaar 21&22; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Cla I/Xho I</i> -Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 1-HA	diese Arbeit

pcDNA3/PKD2 Schleife 2-HA ⁸	6,95	Amp	Insertion einer <i>Afl</i> II-Schnittstelle bei bp 1548-1553 in pcDNA3/PKD2fl-HA; (AATTCG->CTTAAG) über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 23&24; Verdau mit <i>Afl</i> II und <i>Xho</i> I; Einfügen eines HA-Primerpaares (19&20) in den <i>Afl</i> II/ <i>Xho</i> I geschnittenen Vektor	R. Gallagher
pcDNA3/PKD2 Schleife 3-HA ⁹	7,1	Amp	Insertion einer <i>Afl</i> II-Schnittstelle bei bp 1707-1712 in pcDNA3/PKD2fl-HA (CTTTGA->CTTAAG) über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 25&26; Verdau mit <i>Afl</i> II und <i>Xho</i> I; Einfügen eines HA-Primerpaares (19&20) in den <i>Afl</i> II/ <i>Xho</i> I geschnittenen Vektor	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 Schleife 4-HA ¹⁰	7,2	Amp	Insertion einer <i>Afl</i> II-Schnittstelle bei bp 1812-1817 in pcDNA3/PKD2fl-HA (CATGAG->CTTAAG) über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 27&28; Verdau mit <i>Afl</i> II und <i>Xho</i> I; Einfügen eines HA-Primerpaares (19&20) in den <i>Afl</i> II/ <i>Xho</i> I geschnittenen Vektor	R. Gallagher
pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA ¹¹	7,3	Amp	Insertion einer <i>Afl</i> II-Schnittstelle bei bp 1941-1946 in pcDNA3/PKD2fl-HA (CTTCAG->CTTAAG) über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 29&30; Verdau mit <i>Afl</i> II und <i>Xho</i> I; Einfügen eines HA-Primerpaares (19&20) in den <i>Afl</i> II/ <i>Xho</i> I geschnittenen Vektor	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2fl-HA	8,3	Amp	PCR-Amplifiz. von bp-Bereich 2731-2970 von humanem PKD2 mit Primerpaar 31&32 (32 enthält HA-Sequenz) und Einklonierung des PCR-Inserts in <i>Bsa</i> I/ <i>Kpn</i> I geschnittenen pBSII KS/TM4FL (s. 2.1.8.B); Entnahme eines Inserts (von bp-Bereich 67-2970 von humanem PKD2 + HA-Epitop) aus diesem Vektor über <i>Xba</i> I/ <i>Kpn</i> I -> T4 Polymerase und Einklonierung selbigens in <i>Eco</i> R V geschnittenen pcDNA3-Vektor	Prof. Dr. med. R. Witzgall
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA	7,5	Amp	Entnahme eines Inserts (von bp 67-2175 von humanem PKD2) aus pBSII KS/TM4 FL über <i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II und Einklonierung selbigens mit Primerpaar 33&34 (HA-Epitop; Schnittstellen <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I) in <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I geschnittenen pcDNA3-Vektor	Prof. Dr. med. R. Witzgall
pcDNA3/PKD2 (1/561)	7,1	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1749 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&62; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Cl</i> a I-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 3-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/574)	7,1	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1788 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&63; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Cl</i> a I-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 3-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/577)	7,1	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1797 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&64; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Cl</i> a I-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 3-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/578)	7,1	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1800 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&65; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Cl</i> a I-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 3-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/582)	7,1	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1812 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&66; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Cl</i> a I-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 3-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/577)HA	7,2	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1797 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&36; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Afl</i> II-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/576)HA	7,2	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1794 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&37; einkloniert über <i>Bsr</i> G I/ <i>Afl</i> II-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA	diese Arbeit

pcDNA3/PKD2 (1/575)HA	7,2	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1791 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&38; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Afl</i> II-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/574)HA	7,2	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1788 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&39; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Afl</i> II-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/573)HA	7,2	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1785 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&40; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Afl</i> II-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/572)HA	7,2	Amp	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1340-1782 von humanem PKD2 mittels Primerpaar 35&41; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bsr</i> G I/ <i>Afl</i> II-Schnittstellen in pcDNA3/PKD2 Schleife 5-HA	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KFI->AAA	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: AAATTCATC (1789-1797) in GCAGCCGCC von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 42&43	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KFI->KFA	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: ATC (1795-1797) in GCC von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 44&45	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KFI->KAI	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: TTC (1792-1794) in GCC von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 46&47	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KFI->AFI	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: AAA (1789-1791) in GCA von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 48&49	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KLF->AAA	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: AAGCTCTTC (1780-1788) in GCGGCCGCC von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 50&51	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KLF->KLA	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: TTC (1786-1788) in GCC von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 52&53	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KLF->KAF	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: CTC (1783-1785) in GCC von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 54&55	diese Arbeit
pcDNA3/PKD2 (1/703)HA KLF->ALF	7,5	Amp	Mutation des bp-Bereichs: AAG (1780-1782) in GCG von pcDNA3/PKD2(1/703)HA über Mutagenese-PCR mittels Primerpaar 56&57	diese Arbeit
pECFP-C1	4,7	Kan	enthält den CMV-Promotor, ein Neomycin-Resistenzgen und kodiert für die verstärkte, blau fluoreszierende Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i> ; Ziel-DNA wird C-terminal von <i>ECFP</i> -Gen einkloniert	Clontech
pECFP-C1/Sar1a H79G	5,4	Kan	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1-597 von Hamster Sar1aH79G mittels Primerpaar 58&59; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bgl</i> II/ <i>Kpn</i> I-Schnittstellen in pECFP-C1	diese Arbeit, mit Dr. K. Babinger
pECFP-C1/Sar1a T39N	5,4	Kan	PCR-Amplifizierung von bp-Bereich 1-597 von Hamster Sar1aT39N mittels Primerpaar 58&59; Einklonierung des PCR-Inserts über <i>Bgl</i> II/ <i>Kpn</i> I-Schnittstellen in pECFP-C1	diese Arbeit, mit Dr. K. Babinger
pcDNA3/CD8	7,2	Amp	Insert entnommen (von bp-Bereich 66-773 von humaner T-Zell-Oberflächen-Glykoprotein [= CD 8]-cDNA) über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> H I aus pCMUIV/CD8 (s. weiter unten); einkloniert über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> H I-Schnittstellen in pcDNA3	N. Maltry

pUHD10-3	3,15	Amp	enthält den tTA-abhängigen hCMV-Minimalpromotor (oberhalb, also 5'-wärts vom Promotor liegt eine heptamerisierte Tetrazyklin-Operator-Sequenz) und ein Neomycin-Resistenzgen	H. Bujard, ZMBH Heidelberg
pEGFP-N3	4,7	Kan	enthält den CMV-Promotor, ein Neomycin-Resistenzgen und kodiert für eine verstärkt fluoreszierende Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i> ; Ziel-DNA wird N-terminal von <i>EGFP</i> -Gen inkloniert	Clontech
pUHD10-3/ PKD2(1/703), HA,EGFP	6,05	Amp	Entnahme eines Inserts (von bp 67-2175 von humanem PKD2) aus pBSII KS/TM4 FL über <i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II und Inklonierung selbigens mit HA-Primerpaar 60&61 (Schnittstellen <i>Bgl</i> II/ <i>Apa</i> I) in <i>Hind</i> III/ <i>Apa</i> I vorgeschrittenen pEGFP-N3-Vektor; Insert (humanes PKD2 von bp-Bereich 67-2175 + HA-Epitop + EGFP-Sequenz) aus diesem Vektor über <i>Xba</i> I entnommen und in <i>Xba</i> I vorgeschrittenen pUHD10-3-Vektor inkloniert	diese Arbeit, mit Dr. med. N. Brown
pUHD10-3/ PKD2 fl,HA,EGFP	6,9	Amp	PCR-Amplifiz. von bp-Bereich 2731-2970 von humanem PKD2 mit Primerpaar 31&32 (32 enthält HA-Sequenz) und Inklonierung des PCR-Inserts in <i>Bsa</i> A I/ <i>Kpn</i> I geschnittenen pBSII KS/TM4FL;Entnahme eines Inserts (bp-Bereich 67-2970 von humanem PKD2 + HA-Epitop) aus diesem Vektor über <i>Pst</i> I-> T4 DNA Polymerase/ <i>Xho</i> I und Inklonierung selbigens in <i>Bgl</i> II-> Klenow/ <i>Sal</i> I vorbehandelten pEGFP-N3-Vektor; Insert (humanes PKD2 von bp-Bereich 67-2970 + HA-Tag + EGFP-Sequenz) aus diesem Vektor über <i>Bsr</i> G I entnommen und in <i>Bsr</i> G I vorgeschrittenen pUHD10-3 PKD2(1/703)HA,EGFP-Vektor inkloniert	diese Arbeit
pBabePuro	5,1	Amp	enthält ein Puromycin-Resistenzgen unter Kontrolle des SV40 early-Promotors	H. Land, (Morgens- stern.und Land, 1990)
pUHD15-1neo	7,25	Amp	enthält hCMV-Promotor, ein tTA-Gen (kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus tetR und VP16) und ein Neomycin-Resistenzgen	H. Bujard, ZMBH Heidelberg

Tab. 4: Im Rahmen der Doktorarbeit verwendete bzw. hergestellte Plasmide. Amp: Ampicillin/ Kan: Kanamycin; die mit hochgestellten Zahlenangaben versehenen Plasmide sind in der institutseigenen Datenbank unter den folgenden Namen geführt: 1) pET28aΔT7/PKD2C 269 bp; 2) pET28aΔT7/PKD2C 518 bp, 3) pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2C 350 bp; 4) pET47b/PKD2C 518 bp; 5) pET21b/CIP1; 6) pcDNA3/PKD2Loop 1 -HA; 7) pcDNA3/PKD2 Loop 1-HA-AP; 8)-11) pcDNA3/PKD2 Loop 2-5-HA

B. cDNA-Sequenzen/Quellen

Hier sind diejenigen cDNA-kodierenden Plasmide aufgeführt, die für die Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Plasmide (2.1.8.A) verwendet wurden.

Plasmid-Name	Größe in kbp	Selektion	Beschreibung: mit Accession-Nr. von NCBI (wenn möglich)	Quelle
APtag-2	5,8	Amp + Tet	Plasmid kodiert für Basenparbereich 232-1698 (es fehlt Signalpeptid-Bereich: bp 166-231 und die letzten Basenpaare von bp1699-1773) von humaner alkalischer Phosphatase aus Plazenta (Regan Isozyme: ALPP) ACCESSION: NM_001632; CDS: bp 166-1773	C. Brennan, Queen Mary, University of London
pCDM8/s.Ig.7-PKD1	5,8	Amp + Tet	Humane PKD1-cDNA (KG8-Klon) im Bereich von bp 12709-13047 PCR amplifiziert und in pCDM8-Plasmid kloniert ACCESSION: U2 4497 U2 4499; CDS: 136-13047	G. Walz, Universitäts-Klinikum Freiburg
pPC86/CIP-1	pPC86 7,0	Amp	die humane CIP-1 (= PIGEA-14) Sequenz wurde in einem Zwei-Hybrid-Screen mit PKD2C (human) als Köder identifiziert ACCESSION: BK005534; CDS: 73-453	Instituts-interner Screen/ pPC86 von M. Vidal
pPC86-LNI 29.2	pPC86 7,0	Amp	die humane CLIM1 (= LDB2)-Sequenz wurde in einem Zwei-Hybrid-Screen identifiziert mit LMX1B (human) als Köder ACCESSION: NM_001290; CDS: bp 220-1341	Instituts-interner Screen/ pPC86 von M. Vidal
pBSII KS/TM4FL	6,5	Amp	Plasmid mit cDNA-Sequenz für humanes Polycystin-2 (= TM4F1) ACCESSION: NM_000297; CDS: bp 67-2973)	S. Somlo, siehe auch 2.1.7.A
pGEX-4T-1/PKD2-C	7,9	Amp	Plasmid mit cDNA-Sequenz für humanes Polycystin-2 im bp-Bereich 2104-2973 ACCESSION: NM_000297; CDS: bp 67-2973)	S. Somlo, siehe auch 2.1.7.A
pET11d/HA Sar1a H79G	6,3	Amp	Sar1aH79G-Sequenz aus CHO-Zellen (Hamster) wurde PCR amplifiziert und in pET 11d kloniert Keine Sequenz bei NCBI gefunden; Sequenz liegt aber schriftlich im Labor vor; CDS: bp 1-597	W. E. Balch/ T. E. Kreis (Kuge et al., 1994 & Pepperkok et al., 1998)
pET11d/HA Sar1a T39N	6,3	Amp	Sar1aT39N-cDNA aus CHO-Zellen-Bibliothek (Hamster) wurde PCR amplifiziert und in pET11d kloniert Keine Sequenz bei NCBI gefunden; Sequenz liegt aber schriftlich im Labor vor; CDS: bp 1-597	W.E. Balch (Kuge et al., 1994)
pCMUIV/CD8	4,7	Amp	humanes T-Zell-Oberflächen-Glykoprotein (= CD 8)-cDNA wurde PCR amplifiziert und in pCMUIV-Plasmid kloniert ACCESSION: M12828 (Klone pT8.B und pT8.F1.); CDS: bp 66-773	W. Nickel, ZMBH Heidelberg

Tab. 5: Plasmid-Quellen. Amp: Ampicillin / Kan: Kanamycin / Tet: Tetrazyklin

C. Oligonukleotide

Es wurden nur die optimalen Schmelztemperaturen (T_m) derjenigen Oligonukleotide aufgeführt, die für die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Plasmide (2.1.8.A) etabliert wurden.

Name	Nr.	Sequenz: 5' -> 3'	T _m bzw. P. -A.
PKD2(2104/2118)	1	ATTTGCCATATGATCAATGATACTTAC	40°C
PKD2(2359/2373,rc)	2	ATTTGCCTCGAGTCATTCTTGGTCTCCATC	40°C
PKD2(2455/2469)	3	ATTTGCCATATGCCACGTCCCATGAGC	40°C
PKD2(2959/2973,rc)	4	ATTTGCCTCGAGTCATACGTGGACATT	40°C
Pkd 2C fw	5	ATTTGCCAATTGGTATCAATGATACTTACTCT	44°C
Pkd 2C rev	6	ATTTGCCTCGAGTCATAAAGAACTGTGATCCAA	44°C
Pet His up	7	TATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACTCCGC	P.-A.
Pet His low	8	GGAGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCA	P.-A.
CIP1(116/130,EcoRI)	9	ATTTGGAATTCGATGCCTTTCTTTGGG	-
CIP1(493/479,XhoI)	10	ATTTGCCTCGAGTTTTCTCTTCCGGCT	-
PKD1C Bam HI forw	11	ATTTGCGGATCCGAGCCAGCTGGATGGG	67,5°C
PKD1C Xho I rev	12	ATTTGCCTCGAGAGTGCTGCTGGGGTG	67,5°C
CLIM1(EcoRI)2	13	ATTTGGAATTCGACTTCCAACAGCAGC	-
CLIM1(XhoI)2	14	AATGCACTCGAGTTGGGAAGCCTGGGG	-
PKD2 (2104/2121,HRV3C,XbaI)	15	ATTTGCTCTAGACTTGAAGTCCTCTTTCAGGGACCCAT- CAATGATACTTACTCT	50°C
PKD2 (2953/2973rc,PstI)	16	ATTTGCCTGCAGTCATACGTGGACATTAGAACT	50°C
AflIII,L1 (1431/1462)	17	GGCAATTTTCAGCCCTTAAGGCTGATCCGATATG	-
AflIII,L1(1462/1431)	18	CATATCGGATCAGCCTTAAGGGCTGAAATTGCC	-
AflIII-HA-XhoI,upper	19	TTAAGTTACCCATACGATGTTCCAGAT- TACGCTATCGATTGAC	P.-A.
AflIII-HA-XhoI,lower	20	TCGAGTCAATCGATAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG TAAC	P.-A.
Alk. Phos. CLA I	21	ATTTGCATCGATATCATCCTAGTTGAGGAGGAGAA	47°C
Alk. Phos. Xho 1	22	ATTTGCCTCGAGTCAGGGAGCAGTGGCCGTCTCCA	47°C
AflIII,L2 (1533/1567)	23	GGAAGAGATATTGGACTTAAGCATTACAAACTAC	-
AflIII,L2(1576/1533)	24	GTAGTTTGTGAATGCTTAAGTCCAATATCTCTTCC	-
AflIII,L3(1697/1728)	25	CTTCCCAACTTAAGGCATCTGGCATATTGG	-
AflIII,L3(1728/1697)	26	CCAATATGCCAGATGCCTTAAGTTGGGGAAAG	-
AflIII,L4(1797/1836)	27	CAATTTTAACAGGACCTTAAGCCAGCTCTCGACAAC- CATG	-
AflIII,L4(1836/1797)	28	CATGGTTGTCGA- GAGCTGGCTTAAGGTCCTGTAAATTG	-
AflIII,L5(1930/1957)	29	CAGGTCGATGACTTAAGTACTTTCCAAG	60°C
AflIII,L5(1957/1930)	30	CTTGAAAGTACTTAAGTCATCGACCTG	60°C
PKD2 (2731/2751)	31	GCCGAGGATGAAAGGCTGGGT	-
PKD2 (2955/2969 rc)	32	ATTTGCGGTACCTACTCGAGAGCGTAATCTGGAACATC GTATGGGTAGACGTGGACATTAGAA	-
HA-Adapter sense	33	GATCTTCTTAAGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT TAAC	-
HA-Adapter antisense	34	TCGAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTTA AGAA	-
PKD2(1340/1358)	35	ACTTCTCAGTGTACAACGC	43°C
577 AFL II	36	ATTTGCCTTAAGTAGATGAATTTGAAGAGCTTAAT	43°C
576 AFL II	37	ATTTGCCTTAAGTAGAATTTGAAGAGCTTAATCCA	43°C
575 AFL II	38	ATTTGCCTTAAGTATTTGAAGAGCTTAATCCAGACA	43°C
574 AFL II	39	ATTTGCCTTAAGTAGAAGAGCTTAATCCAGACAAA	43°C
573 AFL II	40	ATTTGCCTTAAGTAGAGCTTAATCCAGACAAAAAA	43°C
572 AFL II	41	ATTTGCCTTAAGTACTTAATCCAGACAAAAAATACT	43°C

(KFI->AAA)fw 1/703Ha	42	TGGATTAAGCTCTTCGCAGCCGCCAATTTTAAACAGGACC ATGAGC	50°C
(KFI->AAA)rev 1/703Ha	43	GGTCCTGTAAAAATTGGCGGCTGCGAAGAGCTTAATCCA GACAAAAAATAC	50°C
1/703 KFI-KFA fw	44	CTGGATTAAGCTCTTCAAATTCGCCAATTTTAAACAGGAC CATGAGCC	55°C
1/703 KFI-KFA rv	45	GGTCATGGTCCTGTAAAAATTGGCGAATTTGAAGAGCT TAATCCAG	55°C
1/703 KFI-KAI fw	46	GTCTGGATTAAGCTCTTCAAAGCCATCAATTTTAAACAGG ACCATGAG	55°C
1/703 KFI-KAI rv	47	CTCATGGTCCTGTAAAAATTGATGGCTTTGAAGAGCTTA ATCCAGAC	55°C
1/703 KFI-AFI fw	48	GTCTGGATTAAGCTCTTCGCATTCATCAATTTTAAACAG- GACC	55°C
1/703 KFI-AFI rv	49	GGTCCTGTAAAAATTGATGAATGCGAAGAGCTTAATCCA GAC	55°C
(KLF->AAA)fw 1/703Ha & loop4Ha	50	TTTTTTGTCTGGATTGCGGCCGCCAATTCATCAATTT- TAACAGGACC	60°C
(KLF->AAA)rev 1/703Ha & loop4Ha	51	TAAAATTGATGAATTTGGCGGCCGCAATCCA- GACAAAAAATACTGTGACAGC	60°C
1/703 KLF-KLA fw	52	GTCTGGATTAAGCTCGCCAAATTCATCAATTTTAAACAG- GACC	55°C
1/703 KLF-KLA rv	53	GGTCCTGTAAAAATTGATGAATTTGGCGAGCTTAATC- CAGAC	55°C
1/703 KLF-KAF fw	54	GTCTGGATTAAGGCCTTCAAATTCATCAATTTTAAACAG- GACC	55°C
1/703 KLF-KAF rv	55	GGTCCTGTAAAAATTGATGAATTTGAAGGCCTTAATC- CAGAC	55°C
1/703 KLF-ALF fw	56	CACAGTATTTTTTGTCTGGATTGCGCTCTTCAAATTCATC	50°C
1/703 KLF-ALF rv	57	GATGAATTTGAAGAGCGCAATCCAGACAAAAAATACT- GTG	50°C
Sar1A (Bgl II)	58	TATAGATCTATGTCCTTCATATTTGAC	57°C
Sar1A (Kpn I)	59	ATGGTACCCTAATCGATGTAAGT	57°C
HA (Bgl II/Apa I) up	60	GATCTTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGCC	-
HA (Bgl II/ Apa I) low	61	AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAA	-
rev2expsig	62	ATTTGCATCGATTCATATATTGTTGAAGTGTAT	42°C
rev1expsig	63	ATTTGCATCGATTCAGAAGAGCTTAATCCAGAC	42°C
Rev 6 (export)	64	ATTTGCATCGATTCAGATGAATTTGAAGAGCTTAAT	43°C
rev 3	65	ATTTGCATCGATTCATTTGATGAATTTGAAGAGCTT	42°C
rev 4	66	ATTTGCATCGATTCAGGTCCTGTAAAAATTGATGAA	42°C

Tab. 6: Oligonukleotide. T_m = Schmelztemperatur; P.-A. = Primer-Annealing (s. 2.2.3.L).

2.1.9 Zellen

A. Bakterienstämme

Hier sind diejenigen Stämme aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit zur Transformation (siehe auch 2.2.1.E), DNA-Midipräparation (siehe auch 2.2.3.B) oder späteren Proteinproduktion (siehe auch 2.2.1.E) verwendet wurden.

Name	Selektion	Beschreibung	Quelle
DH5 α	-	Klonierstamm, aber auch als Expressionsstamm nutzbar (nur für Vektoren mit <i>tac</i> -Promotoren wie z. B. pGEX oder pMal)	Stratagene
XL 1-Blue	-	Klonierstamm (z. T. bei Transformation von Mutagenese-PCR-Plasmiden verwendet)	Stratagene
XL 1-Blue superkompetent	-	Klonierstamm (z. T. bei Transformation von Mutagenese-PCR-Plasmiden verwendet)	Stratagene
ElektroMax DH10B™	-	Klonierstamm für Elektroporation	Invitrogen
Sure	Tet	Klonierstamm, der defizient für homologe Rekombination ist (bei Transformation von Mutagenese-PCR-Plasmiden verwendet)	Stratagene
BL21(DE3)	-	Expressionsstamm mit chromosomaler Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines <i>lacUV5</i> -Promotors; geeignet zur Expression von z. B. pET-Vektoren mit T7-Promotoren aber auch von Vektoren mit <i>tac</i> -Promotoren (wie z. B. pGEX oder pMal)	Novagen
BL21(DE3)pLysS	Cla	für das T7 Lysozym - einen natürl. Inhibitor der T7 RNA-Polymerase - kodierend; hierdurch wird erreicht, dass die durch basale Transkription vom <i>lacUV5</i> -Promotor produzierte T7-RNA-Polymerase blockiert wird; weiterhin kann die Expression von toxischen Genen niedrig gehalten werden: das T7 Lysozym hilft auch beim Bakterienaufschluss	Novagen
Rosetta(DE3)pLysS	Cla	siehe auch BL21 (DE3) und BL21 (DE3)pLysS; das pLysS-Plasmid liefert bei diesem Stamm zusätzliche tRNAs für die Kodons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA, um die Synthese eukaryotischer Proteine, die in <i>E. coli</i> selten genutzte Kodons enthalten, erleichtern	Novagen

Tab. 7: Bakterienstämme. Tet: Tetrazyklin / Cla: Chloramphenicol.

Alle weiteren - hier nicht aufgelisteten, transformierten Stämme - entstanden im Verlauf dieser Arbeit durch Transformation der Stämme mit den unter 2.1.8.A. aufgelisteten Plasmiden zum Zweck der rekombinanten Proteinproduktion (siehe auch 3.3 und 3.4).

B. Säuger-Zelllinien

Hier sind diejenigen Zelllinien aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit zur transienten (siehe auch 2.2.2.E) bzw. stabilen (2.2.2.E) Transfektion mit den unter 2.1.8.A genannten Plasmiden verwendet wurden.

Name	Selektion	Beschreibung	Quelle
COS-7	-	Nierenzellen aus der grünen Meerkatze; Abkömmlinge der CV-1-Affen-Zellen, die mit einer im Replikationsursprung defekten SV40-Mutante transformiert wurden; die Zellen erlauben daher durch die kontinuierliche Synthese des großen T-Antigens von SV40 die Amplifizierung von Plasmiden mit einem SV40 spezifischen Replikationsursprung	B. Royer-Pokora, Humangenetik, Heidelberg
LLC-PK ₁	-	Nierenepithelzellen aus dem Schwein	J. Bonventre, MGH, Boston

LtTA-2,22/PKD2 (1/703)HA Klon 7	G 418 und Puromycin	LtTA-2,22 Zelllinie (siehe weiter unten), die stabil mit pUHD10-3/PKD2(1/703)HA und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxyzyklin regulierbare Synthese von PC2(1/703)HA möglich	Dr. sc. hum. A. Cedzich; (Cedzich, 2000)
LtTA-2,22/PKD2 fl-HA Klon 5	G 418 und Puromycin	LtTA-2,22 Zelllinie (siehe weiter unten), die stabil mit pUHD10-3/PKD2fl-HA und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxyzyklin regulierbare Synthese von PC2fl-HA möglich	Dr. sc. hum. A. Cedzich; (Cedzich, 2000)
LtTA-2,22/PKD2 fl,HA,EGFP Klon 39 und 12	G 418 und Puromycin	LtTA-2,22 Zelllinie (siehe weiter unten), die stabil mit pUHD10-3/PKD2fl,HA,EGFP und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxyzyklin regulierbare Synthese von PC2fl,HA,EGFP möglich	diese Arbeit
LtTA-2,22/PKD2 (1/703),HA,EGFP Klon 14	G 418 und Puromycin	LtTA-2,22 Zelllinie (siehe weiter unten), die stabil mit pUHD10-3/PKD2(1/703)HA,EGFP und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxyzyklin regulierbare Synthese von PC2(1/703),HA,EGFP möglich	diese Arbeit
LtTA-2,22	G 418	LLC-PK ₁ -Zellen mit konstitutiver Synthese des Tetrazyklin-Transaktivators (tTA), vermittelt durch die CMV-Promotor-Sequenz auf dem sog. regulatorischen Plasmid (pUHD15-Neo; G418-Resistenz); tTA stellt ein Fusionsprotein aus dem an den Tetrazyklin-Operator bindenden Tetrazyklin-Repressor (tetR) und dem VP16-Protein dar; Tetrazyklin kann an tTA binden und dadurch eine Konformationsänderung des Proteins auslösen, die ein Binden des Fusionsproteins an den Tetrazyklin-Operator unmöglich macht; hierdurch kann die Transkription einer Ziel-DNA-Sequenz, die sich unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-Operators und eines nachgeschalteten Minimal-CMV-Promotors befindet, unterbunden werden; nach Entfernen von Tetrazyklin ist das Fusionsprotein wieder in der Lage, an die Operator-Sequenz zu binden, um die Transkription zu aktivieren; an Stelle von Tetrazyklin wurde in dieser Arbeit sein Derivat Doxyzyklin verwendet, da dieses eine vergleichsweise deutlich höhere Affinität zu tetR aufweist und somit in erheblich niedrigeren Konzentrationen verwendbar ist; letzterer Aspekt wirkt sich wiederum positiv aus, da somit die zelltoxischen Auswirkungen reduziert werden können	Institutseigene Herstellung

Tab. 8: Säuger-Zelllinien.

2.2 Methoden

Vorbemerkung: Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser einer Wasseraufbereitungsanlage (Seralpur PRO 90 CN) angesetzt (Aqua bidest). Wurde wie unter 2.2.4.H und K und 3.4.3 erläutert Calcium-freies bzw. armes Wasser benötigt, so erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt über sog. Chelex (100 Sodium form)-Säulen (von Sigma). Hierzu wurden maximal 20 Liter A. bid. über ein 2 ml-Säulenbett gegeben, welches danach verworfen wurde.

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

A. Anzucht und Lagerung von Bakterien

Lösungen und Medien:

L-Broth (LB)-Medium (Ausubel et al., 2007)	10 g Bacto-Trypton/5 g Bacto-Hefeextrakt/10 g NaCl ad 1000 ml A. bid. -> autoklavieren
Ampicillin	50 mg/ml -> sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml -> sterilfiltrieren
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.)
Tetracyclin	12 mg/ml in 70% Ethanol (p.A.)

Durchführung:

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden unter Verwendung autoklavierten bzw. sterilfiltrierten Materials unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Anzucht von Bakterien für sog. Übernachtskulturen erfolgte ausgehend von einer Stammkultur in Glycerin (bei -80°C gelagert; 2.2.1.E) oder einer Kolonie (2.2.1.D), wobei die Kulturen bei 37°C und 250 rpm (Inkubationsschüttler Unitron) inkubiert wurden. Das angeimpfte Kulturmedium enthielt die für die verwendeten Bakterienstämme entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen:

Ampicillin: 500 $\mu\text{g/ml}$

Chloramphenicol: 34 $\mu\text{g/ml}$

Tetracyclin: 12 $\mu\text{g/ml}$

Kanamycin: 30 $\mu\text{g/ml}$

B. Messung der optischen Dichte

Für die Bestimmung der optischen Dichte (= OD) von Bakterienkulturen wurde 1 ml der entsprechenden Kultur in eine transparente Plastikkuvette überführt und im Spektralphotometer „U-2000“ bei 595 nm vermessen. Wurden Absorptionswerte über 1,0 erreicht, so wurden die Kulturproben je nach Bedarf mit dem entsprechenden Kulturmedium verdünnt und erneut gemessen. Als „Leerwerte“ dienten die verwendeten Kulturmedien.

C. Herstellung von kompetenten Zellen

TSS-Protokoll (Chung et al., 1989)

Puffer und Medien:

L-Broth (LB)-Medium	siehe auch 2.2.1.A.
TSS-Puffer	10% PEG 3350/5% DMSO/25 mM MgSO ₄ in LB-Medium -> sterilfiltrieren

Durchführung:

Ausgehend von einer Übernachtskultur (2.2.1.A; angeimpft aus einer Stammkultur in Glycerin) wurden die genannten Bakterienstämme in frisches LB-Medium ohne bzw. mit entsprechendem Antibiotikum überimpft. Bei einer optischen Dichte (siehe auch 2.2.1.B) zwischen 0,4 bis 0,5 wurden die Bakterien für 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert (Multifuge 3L-R mit Rotor Ch. 2454). Das Bakterienpellet wurde in eiskaltem TSS-Puffer aufgenommen, wobei das Volumen 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens betrug. Entweder wurden die Bakterien sofort für den Transformationsvorgang (2.2.1.D) herangezogen (200 µl) oder bei -80°C weggefroren (ebenfalls in 200 µl-Aliquots).

Elektroporation

Für die Elektroporation wurde im Rahmen dieser Arbeit der ElektroMax DH10B™-Bakterienstamm (Invitrogen) verwendet.

Lösungen und Medien:

L-Broth (LB)-Medium	siehe auch 2.2.1.A
eiskaltes Aqua bidest	siehe auch 2.2 -> autoklavieren -> auf Eis stellen

Durchführung:

Ausgehend von einer 50 ml Übernachtskultur (2.2.1.A; angeimpft aus einer Stammkultur in Glycerin) wurde der genannte Bakterienstamm in 500 ml frischem LB-Medium ohne Antibiotikum zu einer Anfangs-OD von 0,1 angeimpft. Anschließend wurden die Bakterien bei 30°C und 250 rpm (Inkubationsschüttler Unitron) bis zu einer OD von 0,6 inkubiert. Danach wurden 50 ml-Aliquots der Bakteriensuspension für 30 Minuten auf Eis gestellt und im Anschluss daran 10 Minuten lang bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454). Die Pellets wurden in je 50 ml eiskalten A. bid. aufgenommen und für 15 Minuten

auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) und 4°C für 10 Minuten. Anschließend wurden die Pellets in 20 ml eiskaltem A. bid. resuspendiert und wiederum 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakteriensuspensionen wieder 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) abzentrifugiert, wobei die Pellets diesmal in insgesamt 10 ml eiskaltem A. bid. aufgenommen wurden. Nach einem weiteren 15-minütigen Inkubationsschritt auf Eis und einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4000 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) wurden die Bakterien in 1 ml eiskaltem A. bid. resuspendiert und in 100 µl-Aliquots aufgeteilt, die entweder sofort für den Transformationsvorgang (2.2.1.D) verwendet wurden oder nach Zusatz von 100% Glycerin (Endkonzentration 10%) bei –80°C gelagert wurden.

D. Transformation von Bakterien

TSS-Protokoll (Chung et al., 1989; Hanahan et al., 1983)

Lösungen und Medien:

L-Broth (LB)-Medium	siehe auch 2.2.1.A
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton/5 g Bacto-Hefeextrakt/10 g NaCl/15g Bacto-Agar ad 1000 ml A. bid. -> autoklavieren
Ampicillin	50 mg/ml -> sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml -> sterilfiltrieren
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.)
Tetracyclin	12 mg/ml in 70% Ethanol (p.A.)
IPTG	1 M -> sterilfiltrieren
X-gal	25 mg/ml in DMSO (lichtgeschützt aufbewahren)

Durchführung:

Für den Transformationsvorgang wurden 5-10 µl eines Ligationsansatzes (siehe auch 2.2.3.O) bzw. 10-20 ng eines sequenzierten Plasmides (2-3 µl von gekauften/geschenkten Plasmiden) zu 200 µl kompetenten Zellen (2.2.1.C) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 90 Sekunden auf 42°C (Heizblock VLM LS 1) gestellt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 1-2 Minuten wurden 800 µl LB-Medium ohne bzw. mit entsprechendem Antibiotikum zugegeben. Daraufhin erfolgte eine 90-minütige Inkubation der Bakteriensuspension bei 37°C und 250 rpm (Inkubationsschüttler Unitron). Nach Ablauf dieses Inkubationsschrittes wurden unterschiedliche Volumina (200, 300 und 500 µl) der Suspension auf Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika bzw. Selektionsmarkern ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert (Inkubationsschrank Kelvitron t). Die Antibiotika-

Endkonzentrationen entsprachen den unter 2.2.1.A angegebenen Werten, die Endkonzentrationen für IPTG und X-gal für die Blau-Weiß-Selektion waren 0,2 mM und 0,04 mg/ml.

Elektroporation

Lösungen und Medien:

L-Broth (LB)-Medium	siehe auch 2.2.1.A
Aqua bidest	siehe auch 2.2 -> autoklavieren
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton/5 g Bacto-Hefeextrakt/10 g NaCl/15 g Bacto-Agar ad 1000 ml A. bid. -> autoklavieren
Ampicillin	50 mg/ml -> sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml -> sterilfiltrieren
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.)
Tetracyclin	12 mg/ml in 70% Ethanol (p.A.)
IPTG	1 M -> sterilfiltrieren
X-gal	25 mg/ml in DMSO (lichtgeschützt aufbewahren)

Durchführung:

Für den Transformationsvorgang wurden 10 µl eines Ligationsansatzes (siehe auch 2.2.3.O) gegen A. bid. bei RT in Petrischalen für mind. 60 Minuten dialysiert. Anschließend wurden ca. 5 µl der umdialysierten DNA sowie 100 µl-Aliquots der kompetenten ElectroMax DH10B™-Zellen (2.2.1.C) und die Küvetten für 5 Minuten auf Eis vorgekühlt. Danach wurde die DNA zu den Zellen gegeben. Das Ganze wurde vorsichtig gemischt und luftblasenfrei in die Küvetten überführt. Die Elektroporation fand bei RT und 2500 V (Kapazität wurde durch das jeweilige Gerät [Electroporator 2510] festgelegt; die Zeitkonstante sollte immer einen Wert > 4 haben -> die Zeit wurde durch die Entladungszeit des Kondensators festgelegt) statt. Danach wurde 1 ml LB-Medium ohne bzw. mit entsprechendem Antibiotikum auf die Bakteriensuspension gegeben und es folgte ein Inkubationsschritt für 60 Minuten bei 37°C und 200 rpm (Inkubationsschüttler Unitron). Nach Ablauf dieses Inkubationsschrittes wurden unterschiedliche Volumina (200, 300 und 500 µl) der Suspension auf Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert (Inkubationsschrank Kelvintron t). Die Antibiotika-Endkonzentrationen entsprachen den unter 2.2.1.A angegebenen Werten, die Endkonzentrationen für IPTG und X-gal für die Blau-Weiß-Selektion waren 0,2 mM und 0,04 mg/ml.

E. Produktion von Proteinen in *E. coli*

Für die Herstellung von Proteinen in *E. coli* wurden die Stämme BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS und Rosetta(DE3)pLysS (2.1.9.A) verwendet.

Aufnahme von Wachstumskurve und Induktionskinetik

Um die Bedingungen für eine größtmögliche Ausbeute an rekombinant produziertem Protein zu ermitteln, wurde jedes Expressionskonstrukt zunächst in die dafür geeigneten Expressionsstämme (2.2.1.E) transformiert (2.2.1.D). Anschließend wurde eine Kolonie in 5-10 ml LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika versetzt) überimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert (Inkubationsschüttler Unitron). Von dieser Suspension wurde eine Stammkultur, bestehend aus 300 µl 100% Glyzerin (zuvor in Kryoröhrchen autoklaviert) und 600 µl Bakterienkultur erstellt, die bei -80°C gelagert wurde.

Lösungen, Medien und Puffer:

L-Broth (LB)-Medium	siehe auch 2.2.1.A
M9-Minimalmedium	siehe auch 2.2.1.E
NMM-Medium (<u>N</u> ew <u>M</u> inimal <u>M</u> edium)	siehe auch 2.2.1.E
Ampicillin	50 mg/ml -> sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml -> sterilfiltrieren
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.)
IPTG	1 M -> sterilfiltrieren
1x SDS Probenpuffer	1:5 Verdünnung von 5x SDS-Probenpuffer (2.2.4.B)

Durchführung:

Zur Durchführung einer Induktionskinetik wurde zunächst eine sogenannte Übernachtskultur (50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt; 2.2.1.A) aus einer Glyzerin-Stammkultur angeimpft. Diese Übernachtskultur wurde vor der Überimpfung in die Induktionskultur „2-3 mal gewaschen“, um im Falle von Minimalmedium als verwendetem Kulturmedium eine Verschleppung von LB-Medium-Spuren zu vermeiden und um bei Ampicillin-Kulturen freigesetzte β -Lactamase zu entfernen. Dazu wurde die gesamte Suspension bei RT und 4000 g für 5 Minuten (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in dem entsprechenden Medium resuspendiert. Im Anschluss an diesen Schritt wurde die Induktionskultur 1:100 mit der gewaschenen Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 250 rpm (Inkubationsschüttler Unitron)

inkubiert. Bei optischen Dichten (siehe auch 2.2.1.B) von 0,5 bzw. 1 wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG bei 30°C bzw. 37°C und 250 rpm (Inkubationsschüttler Unitron) induziert. Eine Induktionstemperatur von 30°C wurde gewählt, da ein Absenken der Temperatur teilweise zu höheren Ausbeuten an löslich produziertem, aktivem rekombinanten Protein (Schein und Noteborn, 1989) führt. Unmittelbar vor Induktionsbeginn wurde 1 ml Kultur als sog. „vor-Induktionskontrolle“ entnommen und bei 13000 rpm und RT für 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in einem aus der ermittelten optischen Dichte, multipliziert mit dem Wert 200, errechneten μ l-Volumen an 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 100°C inkubiert (Heizblock VLM LS 1). Entsprechend verfahren wurde mit Proben, die nach 1, 2, 4, 8 und 16 h Induktion entnommen wurden. Anschließend wurden gleiche Volumina (zwischen 40-60 μ l) der gesammelten Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.4.B) entsprechender Prozentigkeit aufgetragen, das mit Coomassie (2.2.4.C) angefärbt wurde. Neben dem optischen Vergleich der Bandendicke zwischen den verschiedenen Stämmen bzw. Zeitwerten auf dem Gel diente eine parallel zur Kinetik aufgenommene Wachstumskurve mittels der optischen Dichte als weiteres Kriterium bei der Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen (siehe auch 3.3 und 3.4).

Induktion von Proteinen unter optimalen Kulturbedingungen in LB-Medium

Lösungen und Medien:

L-Broth (LB)-Medium	siehe auch 2.2.1.A.
Ampicillin	50 mg/ml -> sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml -> sterilfiltrieren
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.)
IPTG	1 M -> sterilfiltrieren

Durchführung:

Unmittelbar vor Induktionsbeginn (die vorhergehenden Schritte sind weiter oben unter Aufnahme von Wachstumskurve und Induktionskinetik beschrieben) wurde 1 ml Kultur als sog. „vor-Induktionskontrolle“ für eine etwaige spätere Gelanalyse entnommen und bei 13000 rpm und RT für 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in einem aus der ermittelten optischen Dichte, multipliziert mit dem Wert 200 errechneten μ l-Volumen an 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 100°C inkubiert (Heizblock VLM LS 1). Je nach Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen (siehe weiter oben) wurde die Induktion der Proteinproduktion bei allen in dieser Arbeit verwendeten Expressionsstämmen mit 1 mM IPTG bei einer OD zwischen 0,5-1 gestartet und bei 30°C bzw. 37°C durchgeführt (3.3.2

und 3.4.1). Nach Ablauf der Induktionszeit wurde wiederum 1 ml Kultur als sog. „Induktionskontrolle“ für eine etwaige spätere Gelanalyse abgenommen. Anschließend wurden die Kulturen bis zur weiteren Verarbeitung (siehe weiter unten) bei 4°C ü.N. aufbewahrt. Im Fall des Konstruktes pMAL-c2/PKD2C (siehe auch 2.1.8.A und 3.3.2.C) wurden dem Medium 2 g/l Glucose zugesetzt, um die Synthese des Enzyms Amylase zu hemmen, welches die bei der später folgenden Aufreinigung verwendeten Amylose-Säulen abbauen könnte und somit ein Binden des Fusionsproteins an diese verhindern würde (<http://www.neb.com-FAQs> for pMAL Protein Fusion and Purification System, E. coli, New England Biolabs).

Die für die einzelnen Proteine ermittelten Expressionsbedingungen in LB-Medium sind unter 3.3.2 aufgeführt.

Induktion von Proteinen unter optimalen Expressionsbedingungen in Minimalmedium

Minimalmediumkulturen wurden im Rahmen dieser Arbeit vornehmlich zur Expression von Proteinen herangezogen, die für die NMR-Analyse (2.2.4.L und 3.4) analysiert werden sollten. Bei dieser Analysemethode werden zur besseren bzw. genaueren Strukturbestimmung von Proteinen Markierungen derselben mit ^{15}N , ^{13}C und ^2H notwendig, die über Mediumbestandteile wie z.B. Ammoniumchlorid, Glucose oder D_2O zugesetzt werden sollen (siehe auch weiter unten).

Lösungen und Medien:

M9-Minimalmedium (Ausubel et al., 2007)	<i>Vorbemerkung:</i> alle Lösungen zuvor separat autoklavieren und anschließend steril zusammenpipettieren; H_2O vorlegen und dann $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ tropfenweise zugeben (sonst Niederschlag), danach folgen die anderen Bestandteile: 200 ml M9-Salzlösung pH 7,4/2 ml 1 M $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ /20 ml 20% Glucose/0,1 ml 1 M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l autoklaviertem A. bid. <i>M9-Salzlösung:</i> 239 mM Na_2HPO_4 /110 mM KH_2PO_4 /43 mM NaCl/93 mM NH_4Cl in A. bid., mit 10 M NaOH auf pH 7,4 titrieren
Ampicillin	50 mg/ml -> sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml -> sterilfiltrieren
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.)
IPTG	1 M -> sterilfiltrieren

NMM-Medium (New Minimal Medium) [Gronwald et al., 2001]	<i>Vorbemerkung:</i> alle Lösungen zuvor separat autoklavieren bzw. sterilfiltrieren und anschließend steril zusammenpipettieren: 900 ml Minimalmedium/10 ml SL-Mix/10 ml 60% Glucose/5 ml 3,74 M NH ₄ Cl ad 1 l autoklaviertem A. bid. (keine pH Einstellung)	
	<i>Minimalmedium:</i> 9,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O/3,0 g KH ₂ PO ₄ /0,5 g NaCl/0,25 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O/0,014 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O ad 900 ml A. bid.	
	<i>SL-Mix:</i> 1,0 ml SL-6/0,9 ml 10 x SL-4 ad 10 ml A. bid.	<i>10x SL-4:</i> 500 mg EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O/200 mg FeSO ₄ x 7 H ₂ O ad 90 ml A. bid. (immer frisch ansetzen und Salze immer getrennt lösen wegen Niederschlagsgefahr)
	<i>SL-6:</i> 100 mg ZnSO ₄ x 7 H ₂ O/30 mg MnCl ₂ /300 mg H ₃ BO ₃ /200 mg CoCl ₂ x 6 H ₂ O/10 mg CuCl ₂ x 6 H ₂ O/20 mg NiCl ₂ x 6 H ₂ O/30 mg Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O ad 1000 ml A. bid.	

Durchführung:

Im Fall von deuterierten Minimalmedium-Kulturen (3.4.1 und 2.2.1.E) wurde die Hauptkultur auf Grund der zu erwartenden Wachstumsverzögerungen (pers. Mitteilung Dr. Christina Schreier) 1:20 inokuliert. Alle anderen Schritte entsprachen den weiter oben ausgeführten Erläuterungen.

Die für die einzelnen Proteine ermittelten Expressionsbedingungen in Minimalmedium sind unter 3.4.1 aufgeführt.

Präparation von bakteriellem Zelllysat***Puffer:***

Bindepuffer für Nickel-Säulen	20 mM Tris-HCl pH 8,0/5 mM Imidazol/500 mM NaCl/0,1% Triton X-100
Bindepuffer für Amylose-Säulen	20 mM Tris-HCl pH 7,4/200 mM NaCl/1 mM EDTA pH 8,0
1x SDS Probenpuffer	1:5 Verdünnung von 5x SDS-Probenpuffer (2.2.4.B)

Durchführung:

Zur Gewinnung von Lysat wurden die ü.N. bei 4°C gehaltenen, induzierten Bakterienkulturen (2.2.1.E) zunächst für 20 Minuten bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC2-B mit GSA-Rotor). Das Pellet wurde je nach Epitop-Markierung des rekombinant produzierten Proteins in einem der drei aufgelisteten Bindepuffer auf Eis resuspendiert. Pro 500 ml Bakterienkultur und einem nach der Induktion erreichten OD-Wert von 1,0 wurden dabei 10 ml Bindepuffer verwendet. Sollten die aufzureinigenden Proteine für spätere Quarzmikro-

waagen-Experimente (2.2.4.K) herangezogen werden, wurde kein Triton X-100 in die Bindepuffer und die folgenden Säulenpuffer gegeben (2.2.4.E und 3.3.2). Die Bakteriensuspensionen wurden anschließend auf Eis mittels Ultraschallgerät (Vibra Cell) aufgeschlossen, wobei pro 10-50 ml Suspension 2 Pulse (30 Sekunden) mit 50%iger Intensität des Gerätes gegeben wurden, zwischen denen ein Inkubationsschritt auf Eis von 1 Minute lag. Im Anschluss daran wurden die lysierten Proben bei 4°C und 14000 rpm (Sorvall Superspeed RC2-B mit GSA-Rotor) zentrifugiert. Unmittelbar vor dem Zentrifugationsschritt wurden zwischen 0,1–1 ml geschalltes Lysat abgenommen und ebenfalls bei 4°C und 14000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer entsprechenden Menge an 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in einem Volumen, das zu dem mit SDS-Probenpuffer versetzten Überstand identisch war, in 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Beide Proben wurden für 5 Minuten bei 100°C inkubiert und dienten für etwaige Gelkontrollen zur Abschätzung des Anteils an löslich produziertem Protein. Da jedoch sämtliche im Rahmen dieser Doktorarbeit produzierten Proteine entweder für strukturelle oder funktionelle Untersuchungen verwendet wurden, wurden lediglich die Lysatüberstände zur Proteinaufreinigung herangezogen. Die Pellets mit dem als Einschlußkörperchen produziertem Anteil des jeweiligen Proteins wurden verworfen.

2.2.2 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien

A. Kultivierung von Säuger-Zellen

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent und wurden in einem auf 37°C temperierten Inkubator (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB) mit 5% CO₂-Begasung kultiviert. Alle Arbeiten mit Säugerzelllinien wurden unter sterilen Bedingungen an Zellkulturarbeitsbanken (Heraeus Lamin Air HA 2448 GS) durchgeführt, wobei sämtliche Materialien und Geräte vor Gebrauch mit 70%igem Alkohol behandelt wurden und gegebenenfalls abgeflammt wurden. Pro P10-Schale bzw. T75-Flasche wurden 12 ml Medium und pro P6-Schale bzw. T25-Flasche 5 ml Medium verwendet.

Lösungen und Medien:

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/L)	von PAA bezogen
FBS	30 min hitzeinaktiviert im Wasserbad (56°C)
Puromycin	1 mg/ml -> sterilfiltrieren
G 418	80 mg/ml -> sterilfiltrieren

Doxyzyklin	10 µg/ml -> sterilfiltrieren
------------	------------------------------

Durchführung:*COS-7- und LLC-PK₁-Zellen*

Diese beiden Zelllinien wurden in DMEM-Medium kultiviert, das mit FBS in einer Endkonzentration von 10% versetzt wurde. Die Kultivierung fand in T75- oder T25-Filterflaschen statt, wobei die Zellen alle 3 Tage 1:10 gesplittet (2.2.2.B) wurden.

LtTA-2,22-Zellen

Diese Zelllinie wurde in DMEM-Medium kultiviert, das mit FBS in einer Endkonzentration von 10% versetzt wurde. Weiterhin wurde dem Medium noch G 418 in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben, da diese Zelllinie durch stabile Transfektion (2.2.2.E) von LLC-PK₁-Zellen mit einem das Neomycin-Resistenzgen tragenden Vektor (2.1.8.A und 2.1.9.B) entstanden sind. Die Kultivierung fand in T75- oder T25-Filterflaschen statt, wobei die Zellen alle 3 Tage 1:10 gesplittet wurden (2.2.2.B).

Stabil transfizierte LtTA-2,22-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten stabil transfizierten LtTA-2,22-Zellen (siehe weiter unten und 2.1.8.A und 2.1.9.B) wurden in DMEM-Medium kultiviert, das mit FBS in einer Endkonzentration von 10% versetzt wurde. Weiterhin wurde dem Medium noch G 418 und Puromycin in Endkonzentrationen von 200 µg/ml und 0,5 µg/ml zugesetzt, wobei Puromycin für die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen diente (2.2.2.E). Um die Proteinexpression bei der Kultivierung zu unterdrücken, wurde Doxyzyklin in einer Konzentration von 0,06 µg/ml verwendet. Die Kultivierung fand in T75- oder T25-Filterflaschen statt, wobei die Zellen alle 3 Tage 1:10 gesplittet wurden (2.2.2.B).

B. Passagieren von Zellen

Das Passagieren (auch Splitten genannt) von Zellen bezeichnet das Ablösen von adhären wachsenden Zellen vom Kulturflaschen- bzw. Kulturschalenboden und das anschließende, erneute Aussäen Selbiger in neue Kulturgefäße in den jeweils gewünschten Zelldichten.

Lösungen und Medien:

10x PBS	1,4 M NaCl/100 mM K ₂ HPO ₄ mit 100 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,5 titrieren
Trypsin-EDTA-Lösung	von PAA bezogen
DMEM-Medium mit entspr. Zusätzen	siehe auch 2.2.2.A

Durchführung:

Vor dem Passagieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x PBS pro T25-Flasche bzw. P6-Schale und 10 ml 1x PBS pro T75-Flasche bzw. P10-Schale gewaschen, um störende Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden pro T25-Flasche bzw. P6-Schale 1-2 ml der Trypsin-EDTA-Lösung und pro T75-Flasche bzw. P10-Schale 3-4 ml der Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Danach wurden die Kulturgefäße solange in den 37°C-Inkubationsschrank (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB) gestellt, bis alle Zellen abgelöst waren, d.h. in abgerundeter Form in der Trypsin-Lösung schwammen (i. d. Regel nach 5 Minuten abgeschlossen). Dies wurde am Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100) überprüft. Um die Trypsinaktivität abzustoppen, wurden dann pro T25-Flasche bzw. P6-Schale 3-4 ml des entsprechenden Mediums und pro T75-Flasche bzw. P10-Schale 7-8 ml des entsprechenden Mediums zugesetzt. Nach mehrmaligem Resuspendieren (möglichst luftblasenfrei) wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und bei RT und 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454). Danach wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in entsprechenden Mediummengen aufgenommen, um anschließend in entsprechender Konfluenz (gemessen in Prozent bezogen auf die Fläche der Kulturschale) ausgesät zu werden.

C. Zählen von Zellen

Wurde beim Aussäen anstelle von Konfluenzen genaue Zellzahlen benötigt, so wurden 10 µl der resuspendierten Zellen nach dem Zentrifugationsschritt (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) beim Passagieren (2.2.2.B) in eine Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm²/0,100 mm Tiefe) überführt. Danach wurden die Zellen in der Kammer nach folgendem Prinzip unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100) gezählt:

Alle Zellen aus 4 Quadranten (jeder Quadrant besteht aus 12 kleinen Quadraten) auszählen und daraus den Mittelwert errechnen. Anschließend diesen Wert mit 10000 multiplizieren. Dies entspricht der Anzahl der Zellen pro ml Lösung.

D. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde eine 100% konfluente T25- bzw. T75-Flasche wie unter 2.2.2.B beschrieben gesplittet. Nach dem Zentrifugieren (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in einer DMSO-FBS-Lösung (99% DMSO auf 10% mit FBS verdünnen) resuspendiert, wobei für eine T25-Flasche 3 ml und für eine T75-Flasche 6 ml verwendet wurden. Pro Kryovial wurden ungefähr 1,5 ml Zellsuspension weggefroren. Zunächst wurden die Kryovials in eine Zewarolle gesteckt und in einen Gefrierschrank (-80°C) gegeben, um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten. Nach 1-2 Wochen wurden die Kryovials dann in den Flüssigstickstofftank (ARPEGE TP 100) überführt.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden direkt nach Entnahme der Kryovials aus dem Flüssigstickstofftank (ARPEGE TP 100) die Deckel kurz aufgeschraubt, um ein Platzen des Gefäßes beim Auftauen zu vermeiden. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml des entsprechenden Mediums überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei RT und 900 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch.2454) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 5 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und in eine T25-Flasche überführt.

E. Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion von Säuger-Zellen kann man die transiente und die stabile Transfektion unterscheiden. Bei der erstgenannten Form soll ein Protein nur für kurze Zeit (mehrere Tage) in Zellen produziert werden. Die transfizierte DNA wird hierbei nicht stabil ins das zelluläre Genom integriert. Bei letzterer Transfektionsform kann durch geeignete Wahl von Selektionsmarkern dafür gesorgt werden, dass Zellen die gewünschte DNA dauerhaft in ihr Genom einbauen.

Transiente Transfektion mittels Poly-L-Ornithin (Dong et al., 1993) und DEAE- Dextran (Ausbel et al., 2007)

Lösungen und Medien:

DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung (für COS-7-Zellen)	10 mg/ml DEAE-Dextran/2,5 mM Chloroquin in 1x PBS -> sterilfiltrieren
Poly-L-Ornithin-Lösung (für LLC-PK ₁ und stabil transfizierte LtTA 2,22-Zellen)	10 mg/ml -> sterilfiltrieren
DMEM-Medium mit entspr. Zusätzen	siehe auch 2.2.2.A
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (siehe 2.2.2.B)
DMSO (> 99%)	von Sigma bezogen

Durchführung:

Für die transiente Transfektion wurden am Vortag COS-7- oder LLC-PK₁-Zellen so in eine P6- bzw. P10-Schale gesplittet, dass sie am Folgetag eine Konfluenz zwischen 70-80% erreichten. Je nach verwendeter Zellsorte wurde folgendermaßen verfahren:

- *Für COS-7-Zellen (Angaben pro P6-Schale):*
5 ml des entsprechenden Mediums mit 200 µl DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung mischen und anschließend 15 µg Plasmid-DNA (bei Kotransfektionen 2x 15 µg) dazugeben und ebenfalls gut mischen; nach Absaugen des Mediums wird die Transfektionsmischung auf die Zellen geben; die Zellen 4 Stunden im 37°C-Inkubator inkubieren (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB); danach Transfektionsmischung absaugen und Zellen für 90 Sekunden in DMSO-PBS-Lösung (99% DMSO auf 10% mit 1x PBS verdünnen) inkubieren; danach alles gründlich absaugen und Zellen 2x vorsichtig mit 1x PBS waschen; anschließend Zellen mit entsprechendem Medium versorgen.
- *Für LLC-PK₁-Zellen (Angaben pro P6-Schale):*
3 ml des entsprechenden Mediums mit 3 µl Poly-L-Ornithin-Lösung mischen und anschließend 8 µg Plasmid-DNA [bei Kotransfektionen 2x 7 µg; im Falle der Sar-Mutanten-Experimente unter 3.2.4.C: 8 µg Sar1a H79G bzw. T39N-DNA und 6 µg PKD2(1/703)-kodierende DNA für PC2(1/703)HA] dazugeben und ebenfalls gut mischen; nach Absaugen des Mediums wird die Transfektionsmischung auf die Zellen gegeben; die Zellen 6 Stunden im 37°C-Inkubator inkubieren (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB); danach Transfektionsmischung absaugen und Zellen für 3½ Minuten in DMSO-Lösung (99% DMSO auf 30% mit entspr. Medium ver-

dünnen) inkubieren; danach alles gründlich absaugen und Zellen 2x vorsichtig mit 1x PBS waschen; anschließend Zellen mit entsprechendem Medium versorgen.

Je nach Versuchsansatz (3.1 und 3.2) wurden die transfizierten Zellen in der P6-Schale belassen oder einen Tag nach der Transfektion gesplittet (2.2.2.B) und auf Glas-Deckgläschen (12 mm Durchmesser) ausgesät. Normalerweise wurde 2 Tage nach der Transfektion eine Immunzytochemie (2.2.2.K) durchgeführt oder Zelllysat (2.2.2.G) hergestellt, da hier in der Regel ein Maximum an Proteinsynthese erreicht wird. Erforderte ein Versuchsansatz Zilienbildung (siehe auch 3.2.3.B und 3.2.4.C), so wurden im Fall von LLC-PK₁- Zellen die Zellen einen Tag nach der Transfektion so auf Deckgläser gesplittet, dass sie am nächsten Tag bereits 100% konfluent waren. Um einen hohen Differenzierungsgrad und damit eine hohe Ziliendichte zu erreichen, wurde bis zu 3-4 Tage nach der Transfektion mit der Durchführung der Immunzytochemie (2.2.2.K) gewartet.

Stabile Transfektion mit Poly-L-Ornithin (Dong et al., 1993)

Für stabile Transfektionen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit sog. LtTA-2,22-Zellen (2.1.9.B) herangezogen. Da LtTA-2,22-Zellen bereits mittels G 418 auf das tTA-kodierende Plasmid selektioniert werden (2.1.8.B), wurde als Selektionsmarker für die neu transfizierte pUHD10-3-Plasmid-DNA (2.1.8.A) der sog. pBabePuro-Vektor (2.1.8.A) kotransfiziert, der eine Puromycin-Resistenz vermittelt.

Lösungen und Medien:

Poly-L-Ornithin-Lösung	10 mg/ml -> sterilfiltrieren
DMEM-Medium mit entspr. Zusätzen	siehe auch 2.2.2.A
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS. (2.2.2.B)
DMSO (> 99%)	von Sigma bezogen
Puromycin	1 mg/ml -> sterilfiltrieren
G 418	80 mg/ml -> sterilfiltrieren
Doxyzyklin	10 µg/ml -> sterilfiltrieren

Durchführung (Angaben pro T25-Flasche):

Für die stabile Transfektion wurden am Vortag LtTA-2,22-Zellen so in eine T25-Flasche gesplittet, dass sie am Folgetag eine Konfluenz zwischen 70-80% erreichten. Danach wurde folgendermaßen vorgegangen. 3 ml des entsprechenden Mediums mit 3 µl Poly-L-Ornithin-Lösung mischen und anschließend 8 µg Plasmid-DNA (7 µg Ziel-Protein kodierender Vektor pUHD10-3 und 1 µg Puromycin-Plasmid pBabePuro) dazugeben und ebenfalls gut mischen

(bei LtTA-2,22-Zellen wurde auf G 418 bei diesem Schritt verzichtet); nach Absaugen des Mediums wird die Transfektionsmischung auf die Zellen gegeben; die Zellen 6 Stunden im 37°C-Inkubator inkubieren (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB); danach Transfektionsmischung absaugen und Zellen für 3½ Minuten in DMSO-Lösung (99% DMSO auf 30% mit entsprechendem Medium verdünnen) inkubieren; danach alles gründlich absaugen und Zellen 2x vorsichtig mit 1x PBS waschen; anschließend Zellen mit entsprechendem Medium (enthielt wieder G 418) versorgen.

Einen Tag nach der Tansfektion wurden die Zellen gesplittet (siehe auch 2.2.2.B: 1 ml Trypsin + 3 ml Medium mit G 418), wobei 3 ml bzw. 1 ml der Zellsuspension in je eine P10-Schale gegeben wurden. Nach weiteren 2 Tagen wurde dann mit der Selektion begonnen, indem dem Medium Puromycin in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt wurde. Ungefähr 14 Tage nach der Transfektion konnte man Zellklone ernten. Die geernteten Zellen (in 150 µl Volumen) wurden dann in 2 ml des entsprechenden Mediums (+ Doxyzyklin in einer Endkonz. von 0,06 µg/ml) in eine 24-Loch-Schale überführt und bis zu einer Konfluenz von 70-80% herangezogen. Um nun überprüfen zu können, welcher der gepickten Klone „positiv“ war, wurden die Klone aus der 24-Loch-Platte bei Erreichen der genannten Konfluenz gesplittet (2.2.2.B; 500 µl Trypsin, 1,5 ml Medium zum Abstoppen). Ein Drittel der Zellsuspension wurde wieder in die 24-Loch-Platte zur weiteren Anzucht gegeben (entsprechendes Medium + Doxyzyklin), die restlichen zwei Drittel der Zellsuspension wurden zu gleichen Teilen auf 2 P6-Schalen verteilt und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% weiterkultiviert (entsprechendes Medium + Doxyzyklin). Wurde diese Konfluenz erreicht, dann wurden die Zellen uninduziert bzw. induziert (2.2.2.F) 2-3 Tage in entspr. Medium kultiviert. Anschließend wurde bei genügend hoher Zelldichte Zellysate (2.2.2.G) hergestellt, um per Western-Blot (2.2.4.D) einerseits die positiven Klone zu identifizieren und andererseits die Fähigkeit der jeweiligen positiven Klone im Bezug auf Induktions- bzw. Repressionseffizienz zu überprüfen.

F. Induktion der Proteinproduktion bei stabil transfizierten Zellen

Da im Rahmen dieser Arbeit bei allen stabil transfizierten Zelllinien das sog. Tet-off-System (2.1.9.B) verwendet wurde, konnte die Proteinproduktion durch Zugabe von 0,06 µg/ml Doxyzyklin unterbunden werden. Um die Proteinsynthese zu induzieren, wurde das Doxyzyklinhaltige Medium abgenommen und die Zellen 4x mit 1x PBS gewaschen, um sämtliche Doxy-

zyklin-Reste zu entfernen. Anschließend wurde das entsprechende Medium ohne Doxzyklin auf die Zellen gegeben und die Zellen für 2-3 Tage kultiviert. Als Negativ-Kontrolle wurden aber stets zeitgleich Zellen in Doxzyklin-haltigem Medium kultiviert.

Induktion unter BFA-Einfluss

LtTA-2,22/PKD2 fl-HA- und LtTA-2,22/PKD2(1/703)HA-Klone wurden 48 Stunden lang unter Zugabe von 0,5 µg/ml BFA (*Penicillium brefeldianum*: 1 mg in 500 µl Methanol gelöst) in das entsprechende Medium induziert, wobei die Zugabe von Methanol ins Medium als Negativ-Kontrolle diente. Die LtTA-2,22/PKD2(1/703)HA-Zelllinie erhielt erst 24 Stunden nach der Induktion BFA bzw. Methanol. Als Negativ-Kontrolle wurden zeitgleich Zellen in Doxzyklin-haltigem Medium unter Einfluss von BFA bzw. Methanol kultiviert. 48 Stunden nach der Behandlung mit BFA bzw. Methanol wurden die Zellen einer Immunzytochemie unterzogen (2.2.2.K).

G. Herstellen von Säuger-Zelllysate

Für die Herstellung von Säuger-Zelllysate für Western-Blot-Analysen (2.2.4.D) war eine 70-100% konfluente P6-Schale ausreichend.

Lösungen und Puffer:

1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B)
PBS-Lysepuffer	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B)/1% Triton X-100 (immer frisch herstellen)
Tris-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl/5 mM EDTA pH 8,0
Tris-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl/5 mM EDTA pH 8,0/1% Triton X-100 (immer frisch herstellen)
Aprotinin	10 mg/ml -> -20°C
Leupeptin	10 mg/ml -> -20°C
PMSF	100 mM in 100% Ethanol -> -20°C
SDS-Probenpuffer	5x SDS-Probenpuffer oder entspr. Verdünnungen davon (2.2.4.B)

Durchführung:

Alle Lösungen waren auf Eis vorgekühlt und alle Arbeitsschritte fanden bei 4°C statt. Zur Herstellung von Zelllysate wurden die Zellen entweder in 1x PBS oder dem genannten Tris-Waschpuffer 3-4 x gewaschen. Anschließend wurden 1 ml PBS- oder Tris-Waschpuffer auf die Zellen gegeben und die Zellen mittels eines Zellschabers gerntet. Danach wurden die Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 rpm und 4°C für 5 Minuten

zentrifugiert (Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen entweder in PBS- oder Tris-Lysepuffer [enthielten die Proteaseinhibitoren Aprotinin (10 µg/ml), Leupeptin (10 µg/ml) und PMSF (0,5 mM)] resuspendiert (zwischen 100-150 µl), 30 Minuten auf Eis inkubiert oder nach Schockfrostern in flüssigem Stickstoff bei -80°C weggefroren. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Lysate dann für 45 Minuten bei 4°C und 14000 rpm (Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann einer Bradford-Proteinbestimmung unterzogen (2.2.4.A), um bei späteren Western-Blot-Analysen (2.2.4.D) definierte Lysatmengen laden zu können. Entweder wurden die Lysate danach bei -80°C weggefroren oder für die späteren Western-Blot-Analysen (2.2.4.D) mit einer entsprechenden Menge an SDS-Probenpuffer versehen, 5 Minuten bei 100°C inkubiert und gleich auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (siehe auch 2.2.4.B) entsprechender Prozentigkeit geladen bzw. bei -20°C weggefroren. Zum besseren Vergleich von Proteinsyntheseraten wurden stets gleiche Lysatmengen auf Gele geladen.

H. Gewinnung von Mikrosomen („inside-out-vesicles“) nach Lewis et al. (2001)

Lösungen und Puffer::

1x PBS	1: 10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B)
Puffer A	10 mM Hepes-KOH, pH 7,4/10 mM KCl/1,5 mM MgCl ₂ /5 mM Na-EDTA/5 mM EGTA/250 mM Saccharose (immer frisch eingewogen)
Puffer B	10 mM Hepes-KOH, pH 7,4/10 mM KCl/1,5 mM MgCl ₂ /5 mM Na-EDTA/5 mM EGTA/250 mM Saccharose (immer frisch eingewogen)/100 mM NaCl

Durchführung:

Alle Lösungen waren auf Eis vorgekühlt und alle Arbeitsschritte fanden bei 4°C statt. Für die Gewinnung von Mikrosomen für einen Protease-protection-assay (2.2.2.I) wurden 5 P10-Schalen transient transfizierter COS-7-Zellen (2.2.2.E) 48 Stunden nach der Transfektion (Zellen 100% konfluent) herangezogen. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3x mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen zum Quellen für 15 Minuten bei 4°C in dem Saccharose-haltigen, isotonen Puffer A (enthielt Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) inkubiert (3 ml pro Schale). Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber vom Schalenboden abgelöst und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen, das sich auf Eis befand, überführt. Danach wurde die Hälfte der Zellsuspension in ein 15 ml Zellpotter-Reaktionsgefäß aus Glas gegeben. Die Zellen wurden durch 20 „Hübe“ bei Stufe 10 (Zell-Homogenisator RW 14 H) aufgeschlossen und sofort wieder auf Eis gestellt. Danach wurde die restliche Zellsuspension auf identische Weise aufgeschlossen. Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden die

Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 30 Minuten bei 4°C und 1000 g abzentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Nach Abnahme der Überstände wurden diese erneut für 15 Minuten bei 4°C und 1000 g zentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Die Überstände wurden anschließend in Polyallomer 1,5 ml Reaktionsgefäße (Microfuge®Tube) gegeben und 30 Minuten bei 4°C und 55000 rpm abzentrifugiert (Ultrazentrifuge: Optima™MAX-E mit Rotor TLA-55). Nach Entfernen der Überstände wurden die Pellets (= Mikrosomen) pro Reaktionsgefäß in 200 µl des hypertonen Puffers B aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension zu gleichen Volumenteilen auf 2 Polyallomer 1,5 ml Reaktionsgefäße (Microfuge®Tube) aufgeteilt und für 30 Minuten bei 4°C und 55000 rpm abzentrifugiert (Ultrazentrifuge: Optima™MAX-E mit Rotor TLA-55). Danach wurde wie unter 2.2.2.I beschrieben verfahren.

I. Protease-protection-Assays von Mikrosomen nach Lewis et al. (2001) und Yamaguchi et al. (2003)

Lösungen und Puffer:

Puffer B	siehe auch 2.2.2.H
Puffer B + Triton X-100	siehe auch 2.2.2.H + 1% Triton X-100
Proteinase K	20 mg/ml -> -20°C
PMSF	100 mM in 100% Ethanol
Protein A Sepharose CL-4B	Herstellung einer 50%igen Mischung in 1x PBS -> 4°C
12CA5-Antikörper	<i>einen Tag vor Immunpräzipitation:</i> 500 µl Hybridom-Überstand und 500 µl Puffer B pro 40 µl Sepharose A-Beads (siehe oben) in ein Reaktionsgefäß geben und ü.N. bei 4°C auf Rotator geben-> 50%ige Bead-Suspension in Puffer B herstellen
Aprotinin	10 mg/ml -> -20°C
Leupeptin	10 mg/ml -> -20°C
PMSF	100 mM in 100% Ethanol -> -20°C
5x SDS-Probenpuffer	siehe auch 2.2.4.B
Triton X-100-Lösung	10% Triton X-100

Durchführung:

Alle Lösungen waren auf Eis vorgekühlt und alle Arbeitsschritte fanden bei 4°C statt.

Protease-protection-Assay mit anschließender Immunpräzipitation

Einem Protease-protection-Assay ging immer eine Mikrosomenpräparation (2.2.2.H) voraus. Im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt der Mikrosomenpräparation (2.2.2.H) wurde das Pellet des einen Gefäßes in 220 µl Triton X-100-haltigem Puffer B, das Pellet des

anderen Gefäßes in 220 µl Triton-freiem Puffer B resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Falle der für den PNGase F-Assay (2.2.2.L) vorgesehenen PC2 Schleife 1-HA-Proben wurden beide Pellets in dem Triton-freien Puffer B resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation der Proben in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K. Hierzu wurden die Proben in gleichen Volumenteilen (siehe Pipettierschema weiter unten) auf die einzelnen Reaktionen eines Ansatzes verteilt. Ein Ansatz bestand in der Regel aus 4, im Falle von PC2 Schleife 3-HA aus 6 verschiedenen Reaktionen (siehe Pipettierschema):

Ansatz-Schema für PC2 Schleife 1- und 5-HA:

50 µl Mikrosomen (perm. oder unperm.)
 4 µl Proteinase K bzw. 0 µl Proteinase K
 26 µl entspr. Puffer B bzw. 30 µl entspr. Puffer B

Σ 80µl

Ansatz-Schema für PC2 Schleife 3-HA:

35 µl Mikrosomen (perm. oder unperm.)
 4 u. 16 µl Proteinase K bzw. 0 µl Proteinase K
 26 u. 10 µl entspr. Puffer B bzw. 30 µl entspr. Puffer B

Σ 80µl

Es wurden immer Doppelansätze pipettiert. Im Falle der für den PNGase F-Assay vorgesehenen PC2 Schleife 1-HA-Proben wurden dementsprechend vier Ansätze gefahren (also insgesamt 8 Reaktionen; siehe auch 2.2.2.L). Bei jedem Versuch wurde immer auch ein Doppel- bzw. Vierfachansatz einer Kontrollreaktion angesetzt, die neben dem Triton X-100-freien Puffer B die im Assay verwendete Höchstmenge an Proteinase K enthielt. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 4°C auf einem Dreharm inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 µl der PMSF-Lösung gestoppt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Im Falle der für den PNGase F-Assay (2.2.2.L) vorgesehenen PC2 Schleife 1-HA-Proben wurden die Reaktionen mit 8 µl PMSF gestoppt. Danach wurden die Proben einer Immunpräzipitation unterzogen, der im Falle der für den PNGase F-Assay vorgesehenen PC2 Schleife 1-HA-Proben noch der eigentliche PNGase F-Assay (2.2.2.L) vorausging. Für eine Immunpräzipitation wurden jeweils die einander entsprechenden Reaktionen eines Doppel- bzw. Vierfachansatzes zusammengefasst und mit dem Triton X-100-haltigen Puffer B (enthielt Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) auf ein Volumen von 300 µl gebracht, wobei den „Triton X-100-freien Proben“ vorher noch eine entsprechende Menge einer 10%igen Triton X-100-Lösung in Kombination mit dem Triton X-100-freien Puffer B (enthielt Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) zugesetzt wurde, um wie bei den von Anfang an mit Triton X-100 behandelten Proben auf die Endkonzentration von 1% Triton X-100 zu kommen. Das Ganze wurde zur Permeabilisierung der intakten Mikrosomen-Reaktionen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Jede Reaktion wurde dann mit 260 µl Triton X-100-freiem Puffer B (enthielt Pro-

teaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) aufgefüllt und erhielt 40 µl der 50%igen Suspension von mit 12CA5-Antikörper gekoppelten Sepharose A-Beads (siehe auch weiter oben). Die Proben wurden für 4 Stunden bei 4°C auf einem Dreharm inkubiert. Danach wurden die Proben für 20 Sekunden bei RT und 10000 rpm zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Die Überstände wurden quantitativ abgenommen und für spätere Blot-Analysen (2.2.4.D) bei -80°C weggefroren (i. d. Regel wurden zwischen 60-80 µl Überstand für Gel-Analysen verwendet). Danach wurden die Beads 4x mit 500 µl Triton X-100-freiem Puffer B (enthält Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) gewaschen. Hierzu wurden die Beads in dem Puffer resuspendiert und für 20 Sekunden bei RT und 10000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand restlos abgenommen und die Beads in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer für 3 Minuten bei 100°C inkubiert und bei -20°C weggefroren. Zum Auftragen der Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.4.B) wurden diese nach dem Auftauen noch einmal für 2 Minuten bei 100°C inkubiert, wobei die gesamten 30 µl geladen wurden.

Protease-protection-Assay ohne Immunpräzipitation

Einem Protease-protection-Assay ging immer eine Mikrosomenpräparation (siehe auch 2.2.2.H) voraus. Im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt der Mikrosomenpräparation (2.2.2.H) wurde das Pellet des einen Gefäßes in 170 µl Triton X-100-haltigem Puffer B, das Pellet des anderen Gefäßes in 170 µl Triton X-100-freiem Puffer B resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Proben in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K. Hierzu wurden die Proben in gleichen Volumenteilen (siehe Pipettierschema weiter unten) auf die einzelnen Reaktionen eines Ansatzes verteilt. Ein Ansatz bestand in der Regel aus 4 verschiedenen Reaktionen:

50 µl Mikrosomen (perm. oder unperm.)	25 µl Mikrosomen (perm. oder unperm.)
4 µl Proteinase K bzw. 0 µl Proteinase K	4 µl Proteinase K bzw. 0 µl Proteinase K
26 µl entspr. Puffer B bzw. 30 µl Puffer B	51 µl entspr. Puffer B bzw. 55 µl Puffer B
<hr/>	
Σ 80µl	Σ 80µl

Bei jedem Versuch wurden je nach Anzahl der Ansätze immer auch entsprechende Mengen einer Kontrollreaktion angesetzt, die neben dem Triton X-100-freien Puffer B die im Assay verwendete Höchstmenge an Proteinase K enthielt. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 4°C auf einem Dreharm inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 µl

der PMSF-Lösung gestoppt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit einer entsprechenden Menge an 5x SDS-Probenpuffer versehen, 5 Minuten bei 100°C inkubiert und auf SDS-Polyacrylamid-Gele (2.2.4.B) aufgetragen.

J. Biotinylierungs-Assay nach Pierce Cematical Company (2001) und Altin und Pagler (1995)

Lösungen und Puffer:

Immobilized Neutra-vidin™ Protein	kurz vor Verwendung in Tris-Waschpuffer äquilibrieren -> 50%ige Bead-Suspension in Tris-Waschpuffer herstellen
PBS-Waschpuffer	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 0,1 mM CaCl ₂ + 1 mM MgCl ₂
PBS-Biotin-Puffer	siehe PBS-Waschpuffer + 0,5 mg/ml Biotin
PBS-Glycin-Puffer	siehe PBS-Waschpuffer + 100 mM Glycin
Tris-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl/5 mM EDTA pH 8,0
Tris-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl/5 mM EDTA pH 8,0/1% Triton X-100 (immer frisch herstellen)
Tris-Hochsalz-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5/350 mM NaCl/5 mM EDTA pH 8,0
Aprotinin	10 mg/ml -> -20°C
Leupeptin	10 mg/ml -> -20°C
PMSF	100 mM in 100% Ethanol -> -20°C
2x SDS-Probenpuffer	1:2,5 Verdünnung von 5x SDS-Probenpuffer (2.2.4.B)

Durchführung:

Alle Lösungen waren auf Eis vorgekühlt und alle Arbeitsschritte fanden bei 4°C statt. Für den Biotinylierungs-Assay wurden P6-Schalen (70-100% Konfluenz) transient transfizierter COS-7- oder LLC-PK₁-Zellen (2.2.2.E) verwendet. 48 Stunden nach der Transfektion wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen 4x mit dem PBS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C mit dem PBS-Biotin-Puffer inkubiert, wobei zeitgleich durchgeführte Inkubationsansätze mit PBS-Waschpuffer als Negativ-Kontrollen dienten. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde die Biotin-Lösung abgesaugt. Dann wurden die Zellen 2x mit PBS-Glycin-Puffer gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 4°C in selbigem inkubiert. Daraufhin wurde der Glycin-Puffer abgenommen und 4x mit Tris-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte dann ein Lyseschritt nach dem unter 2.2.2.G aufgeführten Protokoll, wobei der in der Tabelle genannte Tris-Lysepuffer verwendet wurde. Je nach zur Verfügung stehender Lysatmenge wurden zwischen 100 µg und 200 µg Gesamtzelllysat für einen Streptavidin-Pulldown (3.2.3.A) verwendet. Hierzu wurden pro Reaktionsansatz 50 µl einer 50%igen Streptavidin-Bead-Puffer-Mischung mit der genannten Menge an Lysat versetzt. Das Ganze wurde dann mit Tris-Waschpuffer (enthielt Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf einem

Dreharm inkubiert. Das restliche Lysat wurde bei -80°C weggefroren. Am nächsten Tag wurden die Ansätze bei RT für 20 Sekunden bei 10000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Anschließend wurden die Überstände abgenommen und für spätere Western-Blot-Analysen (2.2.4.D) bei -80°C weggefroren. Danach wurden die Streptavidin-Beads 2x mit 500 μl Tris-Waschpuffer (enthält Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) gewaschen. Hierzu wurden die Beads in dem genannten Puffer resuspendiert und für 20 Sekunden bei RT und 10000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Im Anschluss erfolgten 2 Waschschrte in Tris-Hochsalz-Puffer (enthält Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G) und 4 weitere in Tris-Waschpuffer (enthält Proteaseinhibitoren wie unter 2.2.2.G), die nach demselben Prinzip wie vorher beschrieben erfolgten. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Überstand restlos abgenommen und die Beads in 30 μl 2x SDS-Probenpuffer für 30 Minuten bei RT inkubiert und bei -20°C weggefroren. In der Regel wurden 15 μl der in SDS-Probenpuffer resuspendierten Beads für Gelanalysen verwendet. Von den Lysaten und Überständen wurden stets gleiche Mengen für die Gelanalysen verwendet. Hierzu wurden diese mit entsprechenden Mengen an 5x SDS-Probenpuffer versehen und 30 Minuten bei RT inkubiert.

K. Immunzytochemie

Lösungen und Puffer:

Bouin-Lösung	0,1 M Natrium-Phosphat pH 7,4/15 % gesättigte Pikrinsäure/2 % Formalin mit A. bid. zum gewünschten Endvolumen auffüllen
PFA-Lösung	4 g PFA in 80 ml A. bid. + 1 Tropfen 1 M NaOH bei 50°C lösen und abkühlen lassen; danach Zugabe von 10 ml 10x PBS; dann pH mit 1 N HCl einstellen und mit A. bid. auf 100 ml auffüllen
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B)
Hochsalz-PBS-Lösung	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 210 mM NaCl
BSA-PBS-Lösung	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 2% BSA
Triton-PBS-Lösung	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 0,25% Triton X-100
Digitonin-PBS-Lösung	10 mg Digitonin in 10 ml A. bid. bei $95-98^{\circ}\text{C}$ für ca. 5 Minuten lösen und rasch abkühlen lassen (nur wenige Tage bei 4°C stabil)
Hoechst 332T8-Lösung	50 mg Bisbenzimid in 10 ml A. bid. (dunkel bei 4°C aufbewahren)
Glyzerin-PBS-Lösung	40% Glyzerin in 1x PBS

Durchführung:

Die für eine Immunzytochemie vorgesehenen Zellen (auf Deckgläschen ausgesät) wurden zunächst für 1 Stunde bei RT in der Bouin- oder PFA-Lösung (abhängig vom verwendeten Antikörper und Experiment; siehe auch 3.1 und 3.2) fixiert. Danach wurden die Zellen 4-5 mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert. In der Regel wurden die Zellen hierfür bei RT 20 Minuten in der Triton-PBS-Lösung inkubiert. Im Falle der Topologie-Experimente (siehe auch 3.1.1.A) wurden die Zellen zur ausschließlichen Permeabilisierung der Plasmamembran für 15 Minuten bei 4°C in der 1:200 verdünnten Digitonin-PBS-Lösung inkubiert. Sollten die Zellen unpermeabilisiert bleiben, so wurden sie nach der Fixierung für 15 Minuten bei RT in 1x PBS gegeben. Im Anschluss an die Permeabilisierung bzw. Nicht-Permeabilisierung wurden die Zellen 3x in 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte ein Inkubationsschritt bei RT für 1 Stunde in der BSA-PBS-Lösung zur Reduzierung von unspezifischen Antikörperreaktionen. Im Anschluss daran wurden die jeweiligen Primärantikörper auf die Deckgläschen gegeben, wobei die Immunglobuline in der BSA-PBS-Lösung entsprechend den Angaben unter 2.1.7.A verdünnt wurden (bei Doppelfärbungen wurden die beiden Antikörper gleichzeitig inkubiert). Danach wurden die Zellen 1x mit der Hochsalz-PBS-Lösung und 2x in 1x PBS gewaschen.

Dann wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörper in der BSA-PBS-Lösung (Verdünnungen siehe 2.1.7.B) für eine Stunde bei RT zugegeben (bei Doppelfärbungen wurden die beiden Antikörper gleichzeitig inkubiert). Danach erfolgte wiederum ein Waschschrift mit der Hochsalz-PBS-Lösung und 2 Waschschrift mit 1x PBS. Im Anschluss daran wurde eine Kernfärbung für 1 Minute bei RT mittels einer sog. Hoechst 33258-Lösung durchgeführt, die zuvor 1:500 in A. bid. verdünnt wurde. Danach wurden die Zellen noch 3x mit 1x PBS gewaschen und anschließend eingedeckelt. Hierzu wurden die Deckgläser mit der Unterseite auf einen Glasobjektträger gelegt, wobei ca. 40 µl einer Glycerin-PBS-Lösung vorgelegt wurden. Dann wurden neben und auf die Deckgläschen einige Tropfen der Glycerin-PBS-Lösung gegeben. Im letzten Schritt wurden schließlich Deckgläser möglichst luftblasenfrei auf den Objektträger aufgelegt. Die Objektträger wurden in entsprechenden Mappen bei 4°C im Kühlschrank dunkel gelagert. Die Bilddokumentation erfolgte entweder am Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit DMC 2-Kamera oder am Konfokalmikroskop LSM 510 Meta (3.1 und 3.2). Das Axioskop 20 enthält eine Quecksilberdampfampe (HBO), wobei die Bilder mit Zeiss-Standardfiltern für Hoechst/DAPI (G 365; FT 395; LP 420), FITC bzw. GFP (450-490; FT 510; 515-565 oder 450-490; FT 510; LP 520) und Cy3 (BP 546; FT

580; LP 590) aufgenommen wurden [G: glockenförmig; LP: Langpaß; BP: Bandpaß; FT: Farbteiler]. Bei FITC/Cy3-Doppelfärbungen wurden die Bilder mit (450-490; FT 510; 515-565) und (BP 546; FT 580; LP 590) aufgenommen. Als Objektiv wurde immer x40/1.40 Öl gewählt. Das LSM 510 Meta besitzt 3 Gas-Laserlampen: Argon, He-lium-Neon 1 und 2. Die Bilder am LSM 510 wurden bei Anregungswellenlängen von 458 nm für CFP, 488 nm für GFP bzw. FITC und 543 nm für Cy3 mit entsprechenden Schmalband-Fluoreszenz-Filtern aufgenommen. Als Objektive wurden x40/1.40 Öl oder x63/1.40 Öl gewählt. Doppel- und Tripel-Färbungen wurden im Multi-Tracking-Verfahren aufgenommen. Die Konfokalblende wurde bei allen Aufnahmen auf eine Airy-Unit eingestellt.

L. Deglykosylierungsexperimente

EndoH_F-Assays

Puffer:

10 x Denaturierungspuffer	von NEB bezogen
10 x G5-Reaktionspuffer	von NEB bezogen
5x SDS-Probenpuffer	siehe auch 2.2.4.B

Durchführung:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Endo H_F-Assays Gesamtzelllysate (siehe auch 2.2.2.G) transient transfizierter (2.2.2.E) COS-7- oder LLC-PK₁-Zellen verwendet. In der Regel wurden zwischen 10-30 µg Lysatmenge pro Reaktion eingesetzt, wobei für jede Reaktion Doppelansätze pipettiert wurden, um für die spätere Western-Blot-Dokumentation (siehe auch 2.2.4.D) einen Enzym-freien Kontrollansatz (siehe weiter unten) zu haben. Zunächst mussten die Proben denaturiert werden. Hierzu wurden die genannten Lysatmengen und 1/10 Volumenanteil des 10x Denaturierungspuffers bezogen auf das Reaktionsvolumen zusammenpipettiert. Anschließend wurde die Reaktion mit dem verwendeten Lysepuffer (siehe auch 2.2.2.G) auf das Endvolumen (10-11 µl) aufgefüllt. Das Ganze wurde dann für 30 Minuten bei 42°C (Heizblock „VLM LS 1“) inkubiert, wobei nach 15 Minuten ein Zentrifugationsschritt bei RT und 13000 rpm für 10 Sekunden (Tischzentrifuge “Biofuge pico” mit Rotor Sorvall 3329), zum Abzentrifugieren des Kondenswassers durchgeführt wurde. Im Anschluss an die Denaturierung erfolgte die Deglykosylierungsreaktion. Hierzu wurden in die Denaturierungsreaktion 1/10 Volumenanteil des 10x G5-Reaktionspuffers bezogen auf das Reaktionsvolumen (15 µl) und 1 µl Enzym (1000 U/µl) einpipettiert, wobei in die Enzym-

freie Kontrolle anstelle des Enzyms 1 µl Lysepuffer pipettiert wurde. Anschließend wurden die Reaktionen mit dem verwendeten Lysepuffer auf das genannte Endvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden für 1½ Stunden bei 37°C (Inkubationsschrank Kelvitron t) inkubiert, wobei nach 45 Minuten ein Zentrifugationsschritt bei RT und 13000 rpm für 10 Sekunden (Tischzentrifuge “Biofuge pico” mit Rotor Sorvall 3329), zum Abzentrifugieren des Kondenswassers durchgeführt wurde. Die Reaktionen wurden durch Zugabe einer entsprechenden Menge an 5x SDS-Probenpuffer (2.2.4.B) abgestoppt, 30 Minuten bei RT inkubiert und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.4.B) mit anschließender Western-Blot-Analyse (2.2.4.D) unterzogen.

PNGase F-Assays

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden PNGase F-Assays nur für die Proteinase K (2.2.2.I) behandelte PC2 Schleife 1-HA Mikrosomenpräparation angewandt.

Puffer und Lösungen:

10x Denaturierungspuffer	von NEB bezogen
10x G7-Reaktionspuffer	von NEB bezogen
10% NP-40	von NEB bezogen
5x SDS-Probenpuffer	siehe auch 2.2.4.B

Durchführung:

Nach dem Proteinase K-Verdau (2.2.2.I) wurde jede der 8 Reaktionen aus den 4 Doppelansätzen zu gleichen Volumenteilen (2x 30 µl) auf jeweils 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit 4 µl 10x Denaturierungspuffer und 6 µl des Triton-freien Hepes-Puffers (2.2.2.H.) auf ein Endvolumen von 40 µl gebracht. Danach erfolgte eine Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 100°C (Heizblock „VLM LS 1“), wobei das Ganze nach 5 Minuten durch Auf- und Abpipettieren kurz durchmischte wurde. Danach erfolgte die eigentliche Deglykosylierungsreaktion, wobei 1 µl PNGase F (500 U/µl) in die eine Hälfte der zuvor aufgeteilten 8 Reaktionen gegeben wurde. Die andere Hälfte der Reaktionen erhielt als Enzym-freie Kontrolle 1 µl des Triton X-100-freien Hepes-Puffers. Im Anschluss wurden zu jeder Probe noch 6 µl 10x G7-Reaktionspuffer sowie 6 µl 10%iges NP-40 gegeben. Mit dem Triton X-100-freien Hepes-Puffer (2.2.2.H) wurden die Reaktionen dann auf ein Endvolumen von 60 µl aufgefüllt und für 90 Minuten bei 37°C (Inkubationsschrank Kelvitron t) inkubiert. Danach wurden die Proben der unter 2.2.2.I erläuterten Immunpräzipitation unterzogen.

2.2.3 Arbeiten mit DNA

DNA wurde stets bei -20°C in A. bid. aufbewahrt.

A. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für analytische Zwecke („Minipräparation“)

Lösungen und Puffer:

Alkali-SDS-Lösung	0,2 M NaOH/1%SDS (immer frisch ansetzen)
GTE-Puffer	50 mM Glukose/25 mM Tris pH 8,0/10 mM EDTA pH 8,0
RNase A	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in A.bid. lösen -> 10 min bei 100°C inkubieren
Kaliumacetat-Lösung	5 M Kaliumacetat mit 5 M Essigsäure auf pH 4,8 titrieren
Ethanol (100%)	von J. T. Baker bezogen: 100%
Ethanol 70%	Verdünnung in A. bid.
A. bid.	siehe auch 2.2 -> autoklavieren

Durchführung:

Für die Plasmid-DNA-Minipräparation wurden Bakterien einer Kolonie (2.2.1.E) oder einer Glycerin-Stammkultur (2.2.3.B) in 5 ml LB-Medium wie unter 2.2.1.A beschrieben über Nacht angezogen. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden für 3 Minuten bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Anschließend wurde das Pellet in 100 μl GTE-Puffer und 1 μl der RNase-Lösung auf dem Vortexer (Vortex-Genie 2, Stufe 10) re-suspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 200 μl Alkali-SDS-Lösung zu den Proben gegeben und das Ganze durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach maximal 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden 150 μl eiskalte Kaliumacetat-Lösung zugegeben, gefolgt von einem etwa eine Sekunde andauernden Vortexschritt. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis erfolgte ein 2-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und RT (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für zwei Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Im Anschluss daran wurde der Überstand (~ 400 μl) mit 900 μl 100%igem Ethanol durch Invertieren gemischt und für ca. 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Die Pellets wurden dann in 900 μl 70%igem Ethanol aufgenommen und erneut bei RT und 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329), wobei diese letzten beiden Schritte einmal wiederholt wurden. Zuletzt wurden die DNA-Pellets bei RT oder 37°C getrocknet (Inkubationsschrank Kelvitron t) und dann in 35 μl A. bid. gelöst. Die DNA wurde anschließend einem Restriktionsverdau (2.2.3.J) unterzogen.

B. Präparative Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* („Midipräparation“)

Lösungen und Puffer:

Wizard <i>Plus</i> Midiprep-Kit	von Promega bezogen
A. bid.	siehe 2.2 -> autoklavieren -> bei 65°C inkubieren

Durchführung:

Für die Plasmid-DNA-Midipräparation wurden Bakterien einer Glycerin-Stammkultur (siehe weiter unten) oder einer „Minipräparations-Übernachtskultur“ (2.2.3.A) in 200-250 ml LB-Medium wie unter 2.2.1.A beschrieben über Nacht angezogen. Zur Plasmid-Isolierung wurde der Wizard *Plus* Midiprep-Kit verwendet. Zunächst wurde die gesamte Bakterienkultur bei 4°C und 4000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert (Sorvall superspeed RC2-B mit GSA Rotor). Das Pellet wurde anschließend in 3 ml Resuspensionslösung aufgenommen und nach Zugabe von 3 ml Lyselösung vorsichtig durch Schwenken gemischt und für maximal 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Neutralisationslösung wurden die Proben erneut gemischt und danach bei 14000 rpm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12158). Der Überstand wurde anschließend filtriert und mit 10 ml gut resuspendiertem Bindeharz vermischt. Das Ganze wurde dann in eine mitgelieferte Plastik-Säule überführt, die auf ein Vakuumgestell montiert wurde, das an eine Wasserstrahlpumpe gekoppelt war. Um ein effizientes Binden der DNA an die Säule zu gewährleisten, wurde das Vakuum zunächst so gering wie möglich aufgedreht. Nachdem die DNA-haltige Lösung durchgelaufen war, erfolgten 2 Waschschrte mit je 15 ml Waschlösung, die bei maximal möglicher Vakuumpumpenleistung erfolgten. Danach wurden die Säulen für 60 Sekunden mittels voller Pumpenleistung getrocknet. Um den restlichen Ethanol zu entfernen, wurden die DNA-enthaltenden Säulenteile in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 2 Minuten bei RT und 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Anschließend wurden die Säulchen in neue 1,5 ml Gefäße gesteckt und mit 300 µl 65°C warmen A. bid. beladen und für 1 Minute bei RT inkubiert. Die DNA-Elution erfolgte dann durch einen 20 Sekunden andauernden Zentrifugationsschritt (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) bei 13000 rpm und RT. Die DNA wurde anschließend einem Restriktionsverdau (2.2.3.J) unterzogen. Erfolgte der Verdau im Rahmen einer Klonierung und ergaben sich dabei sog. positive Klone, so wurden die entsprechenden Bakteriensuspensionen als Glycerin-Stammkulturen weggefroren (2.2.1.E).

C. Konzentrationsbestimmung von DNA

Durchführung:

Für die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung wurde eine DNA-Lösung (in A. bid.) mit A. bid. 1:100 bzw. 1:20 verdünnt und luftblasenfrei in eine schwarze Quarzküvette überführt. Im Anschluss daran wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Als Leerwert diente Aqua bidest. Die DNA-Konzentration errechnete sich dabei wie folgt: Absorption von 1,0 entspricht 50 ng/µl doppelsträngiger DNA (Chargaff, 1955).

Eine Alternative zur photometrischen Konzentrationsbestimmung stellen Agarose- bzw. native Polyacrylamid-Gele dar. Hierbei wurde eine DNA-Lösung wie unter 2.2.3.F bzw. 2.2.3.G geschildert auf ein Gel aufgetragen. Die Menge an geladener DNA wurde durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration bestimmt. Pro Gel wurden in dieser Arbeit 10 µl Molekulargewichtsstandard (2.2.3.F oder 2.2.3.G) aufgetragen. Dies entspricht 100 ng Molekulargewichtsstandard-DNA. Gemäß der Firmenangaben ergeben sich dabei folgende DNA-Mengen für die einzelnen Standard-DNA-Fragmente:

23130 bp 47,7 ng	9416 bp 19,4 ng	6557 bp 13,5 ng	4361 bp 9 ng	2322 bp 4,8 ng	2027 bp 4,2 ng	1353 bp 25,1 ng	1078 bp 20,0 ng
872 bp 16,2 ng	603 bp 11,2 ng	564 bp 1,1 ng	310 bp 5,8 ng	281 bp 5,2 ng	271 bp 5,0 ng	234 bp 4,3 ng	194 bp 3,6 ng
118 bp 2,2 ng	72 bp 1,4 ng						

D. Phenolisierung von DNA

Lösungen und Puffer::

PCI (Roti-Phenol/C/I)	50% (v/v) <u>P</u> henol/50% (v/v) <u>C</u> hloroform/1% <u>I</u> soamylalkohol (von Roth)
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat-Lösung mit konz. Essigsäure auf pH 5,2 titrieren
Ethanol (100%)	von J. T. Baker bezogen: 100%
Ethanol 70%	Verdünnung in A. bid.
A. bid.	siehe auch 2.2 ->autoklavieren

Durchführung:

Zunächst wurde das Volumen der zu phenolisierenden DNA-Lösung mit der Pipette vermessen. Anschließend wurde ein identisches Volumen des bereits fertigen PCI-Gemisches hinzu-

gegeben. Das Ganze wurde auf dem Vortexer (Vortex-Genie 2, Stufe 10) durchmischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben erneut gevortext und 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Vortex-Schritt, an den sich unmittelbar ein Zentrifugationsschritt (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) von 10 Minuten und 13000 rpm bei RT anschloß. Bei erfolgreicher Phasentrennung (3 Phasen) wurde die obere, DNA enthaltende Wasserphase abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde wie unter 2.2.3.E beschrieben weiterverfahren.

E. Fällung von DNA unter Standardbedingungen

Lösungen und Puffer:

Natriumacetat-Lösung	siehe 2.2.3.D
Ethanol (100%)	von J. T. Baker bezogen: 100%
Ethanol 70%	siehe 2.2.3.D
A. bid.	siehe auch 2.2 ->autoklavieren

Durchführung:

Zunächst wurde das Volumen der zu fällenden DNA-Lösung mit der Pipette vermessen. Anschließend wurde ungefähr das 2,7-fache Volumen an 100%igem Ethanol und 1/10 Volumenanteil an Natriumacetat-Lösung hinzugegeben. Das Ganze wurde durch Invertieren gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben bei 4°C und 14000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) abzentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde anschließend 3x in 900 µl 70%igem Ethanol aufgenommen und erneut 3 Minuten bei RT und 13000 rpm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) zentrifugiert. Die letzten beiden Schritte wurden noch 2 mal wiederholt. Die DNA-Pellets wurden dann bei RT oder 37°C (Inkubationsschrank Kelvintron t) getrocknet und in dem gewünschten Volumen an autoklaviertem A. bid. gelöst.

F. Agarose Gele

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung großer DNA-Fragmente (> 600 bp) dienen Agarose-Gele. Die Elektrophorese erfolgte je nach Trennproblem in Gelen mit einem Agarosegehalt von 0,8 bis 2% (w/v).

Lösungen und Puffer:

50x TAE-Puffer	2 M Tris/0,1 mM EDTA (freie Säure) mit Essigsäure auf pH 8,0 titrieren
----------------	--

5x Probenpuffer	15% Ficoll type 400/50 mM EDTA pH 8,0/0,5% SDS/0,125% Bromphenolblau/0,125% Xylencyan FF
Laufpuffer (1x TAE-Puffer)	1:50 Verdünnung von 50x TAE
Geltyp	Horizontalgele: Agarose-Gelelektrophorese Midi (150 ml)- bzw. Minisystem (25 ml) EASY-CAST bzw. Horizon 58
Ethidiumbromid	1 mg/ml in A. bid.
Molekulargewichtsstandard: Lambda DNA/ <i>Hind</i> III & ΦX174 DNA/ <i>Bsu</i> R I (<i>Hae</i> III)- Marker (von Fermentas)	40 µl Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker (0,5 mg/ml)/40 µl ΦX174 DNA/ <i>Bsu</i> R I (<i>Hae</i> III) Marker (0,5 mg/ml)/400 µl 5x Probenpuffer (siehe weiter oben) ad 2 ml A. bid.

Durchführung:

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst (Heizplatten mit Magnetrührer MR 3001) und nach kurzzeitigem Abkühlen mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml versehen. Nach gutem Durchmischen der beiden Lösungen wurde die Gellösung luftblasenfrei in die Apparatur gegossen und bei RT zur Aushärtung gebracht. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht und photographiert (Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationssystem Gel Max). Größe und Menge an geladener DNA wurde durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration (2.2.3.C) bestimmt. Für sogenannte präparative Gele wurden je nach dem zu ladenden Probenvolumen eine bestimmte Menge an Kammtaschen mit Autoklavierband abgeklebt. Die Elektrophorese erfolgte zur besseren Fragmentauftrennung bei ~100 V. Die DNA-Banden gewünschter Größe wurden nach der Photodokumentation mit einem Skalpell ausgeschnitten und der Elektroelution (2.2.3.H) unterzogen.

G. Native Polyacrylamid-Gele für DNA-Analysen

Zur Größenbestimmung und Präparation kleinerer DNA-Fragmente (< 600 bp) wurden 5-20%ige native Polyacrylamid-Gele benutzt.

Lösungen und Puffer:

AA/BA-Lösung	29 g Acrylamid/1 g Bisacrylamid in 100 ml A. bid. (≤ 1 Monat bei 4°C lagern)
5x TBE-Puffer	445 mM Tris-Borat/10 mM EDTA pH 8,0 (pH sollte zwischen 8,0 und 8,3 liegen)
5x Probenpuffer	50 mM EDTA pH 8,0/50 mM Tris-HCl pH 8,0/50% (v/v) Glycerin/0,25% Bromphenolblau/ 0,25% Xylencyan FF
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin

APS	10% (w/v) in H ₂ O (≤ 1 Monat bei 4°C lagern)
Laufpuffer (1x TBE-Puffer)	1:5 Verdünnung von 5x TBE-Puffer
Geltyp	vertikales Gel (14 cm x 12 cm x 1,5 mm): SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System SE 600 Series Elektrophoresis Unit
Ethidiumbromid	1 mg/ml
Molekulargewichtsstandard: Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker & ΦX174 DNA/ <i>Bsu</i> R I (<i>Hae</i> III)-Marker (von Fermentas)	siehe 2.2.3.F

Durchführung:

8%ige Gele enthielten in einem Endvolumen von 60 ml:

AA/BA-Lösung (29%/1%)	16 ml
5x TBE	12 ml
A. bid.	32 ml
TEMED	34 µl
APS	250 µl

Nach gutem Durchmischen der Gellösung wurde diese luftblasenfrei in die Vorrichtung gegossen. Nach 50-60 Minuten Polymerisationszeit waren die Gele gebrauchsfertig. Die Kammtaschen wurden nach dem Ziehen des Kammes und unmittelbar vor Probenauftrag gründlich mit Laufpuffer gespült. Die Elektrophorese erfolgte bei ~5 V pro cm (~80 V) Elektrodenabstand unter Kühlung (10°C), um einer Überhitzung vorzubeugen. Im Anschluss daran wurden die Gele zur Visualisierung der geladenen DNA für ungefähr 5-10 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung (0,4 µg/ml) gelegt. Danach wurden die Gele zur Reduzierung des Hintergrundes in ein Wasserbad überführt. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht und photographiert (Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationssystem Gel Max). Größe und Menge an geladener DNA wurde durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration (2.2.3.C) bestimmt. Für sogenannte präparative Gele wurden je nach dem zu ladenden Probenvolumen eine bestimmte Menge an Kammtaschen mit Autoklavierband abgeklebt. Die DNA-Banden gewünschter Größe wurden nach der Photodokumentation mit einem Skalpell ausgeschnitten und der Elektroelution (2.2.3.H) unterzogen.

H. Elektroelution**Puffer:**

1x TAE-Puffer	siehe auch 2.2.3.F
---------------	--------------------

1x TBE-Puffer	siehe auch 2.2.3.G
Aqua bidest	siehe auch 2.2

Durchführung:

Die aus einem Agarose- oder Polyacrylamid-Gel ausgeschnittenen Gelstücke wurden in einen Dialyseschlauch überführt, der nach mehrmaligem Spülen in A. bid. mit dem jeweiligen 1x Elektrophoresepuffer gefüllt und an beiden Enden mit Klammern fest verschlossen wurde. Die Elektroelution erfolgte in einer Elektrophoresekammer (2.2.3.F) bei 100 V für 1 Stunde. Danach wurde für ungefähr 30 Sekunden umgepolt, um an der Membran adsorbierte DNA zu lösen. Anschließend wurde die DNA-haltige Pufferlösung aus dem Schlauch genommen, wobei das Gelstück auf dem UV-Schirm auf verbliebene DNA kontrolliert wurde. Gegebenenfalls wurde ein weiterer Elutionsschritt unter den geschilderten Bedingungen für 30 Minuten durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde dann über Elutip-Säulen ankonzentriert (2.2.3.I).

I. Ankonzentrierung von DNA über Elutip-Säulen**Lösungen und Puffer:**

Ladepuffer	0,2 M NaCl/1 mM EDTA/20 mM Tris-HCl pH 7,4
Elutionspuffer	1 M NaCl/1 mM EDTA/20 mM Tris-HCl pH 7,4
Ethanol (100%)	von J. T. Baker bezogen
Aqua bidest	siehe 2.2 -> autoklavieren

Durchführung:

Vor dem Laden der DNA wurden die Säulen zunächst mit 3 ml Elutionspuffer und dann mit 3 ml Ladepuffer äquilibriert. Nach dem Auftragen der DNA wurde diese in 450 µl Elutionspuffer eluiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol, gefolgt von mehrmaligem Invertieren. Anschließend wurde die DNA bei 14000 rpm und 4°C für 30 Minuten pelletiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Die DNA-Pellets wurden bei RT oder 37°C (Inkubationsschrank Kelvitron t) getrocknet und je nach Menge in 10-25 µl autoklaviertem A. bid. gelöst. Die Menge an eluierter DNA wurde auf einem Agarose-Gel bzw. photometrisch (2.2.3.F und 2.2.3.C) bestimmt.

J. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**Puffer und Lösungen:**

10x Reaktionspuffer	von NEB bzw. Fermentas bezogen
---------------------	--------------------------------

Puffer-Zusätze wie BSA, DTT etc.	von NEB bzw. Fermentas bezogen
Aqua bidest	siehe 2.2 -> autoklavieren

Durchführung:

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in A. bid. gelösten DNA 1/10 Volumenanteil des 10x Reaktionspuffers bezogen auf das Reaktionsvolumen und 2-6 U Enzym pro 1 µg eingesetzter Menge an Plasmid-DNA. Die eingesetzte Enzymmenge überschritt dabei nie 10% des Endvolumens, was einer Glycerin-Endkonzentration von 5% entspricht (stellt Schwellenwert für mögliche Staraktivität dar). Falls erforderlich wurden noch Zusätze wie zum Beispiel BSA (abhängig von Herstellerangaben) beigefügt, ansonsten wurde die Reaktion mit A. bid. zum gewünschten Endvolumen aufgefüllt. Die Verdaureaktionen wurden anschließend bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für eine bis mehrere Stunden (z.T. auch ü.N.) inkubiert. Zur Überprüfung der Spaltreaktion wurden zwischen 100-500 ng DNA auf ein Gel aufgetragen (2.2.3.F oder 2.2.3.G). Bei einem analytischen Verdau wurden in der Regel 500 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 µl verdaut. Für Doppelverdaus wurden beide Enzyme gleichzeitig in einem für beide Enzyme kompatiblen Puffer zugegeben. Bei einem präparativen Restriktionsverdau für Klonierungen wurden von Plasmiden, die als Vektoren dienten, 10 µg eingesetzt, von Plasmiden, denen die Insert-DNA herausgeschnitten wurde, 25 µg. Waren Schritte wie Klenow-Behandlung (2.2.3.K) oder Phenolisierung (siehe weiter unten und 2.2.3.D) erforderlich, wurden wegen des DNA-Verlustes Doppelansätze für Insert- und Vektor-DNA angesetzt. Bei Doppelverdaus wurden beide Enzyme nacheinander in einem für beide Enzyme kompatiblen Puffer zugegeben. Das erste Enzym wurde in einem Reaktionsvolumen von 100-150 µl eingesetzt. Nach erfolgreichem Verdau wurde das zweite Enzym zugegeben, wobei das Puffervolumen auf 200 µl erhöht wurde. Bei Bedarf wurden dabei für das zweite Enzym notwendige Salze bzw. Zusätze beigefügt. Waren die Pufferbedingungen der Enzyme jedoch nicht vereinbar, so wurde zwischen beiden Verdauschritten eine Phenolisierung mit anschließender Fällungsreaktion (2.2.3.D) durchgeführt.

K. Herstellung von „glatten Plasmid-DNA-Enden“

Konnten sog. glatte Enden nicht durch Verwendung geeigneter Endonukleasen wie zum Beispiel *EcoR* V hergestellt werden, so wurden im Rahmen dieser Arbeit Enzyme wie Klenow DNA Polymerase oder T4 DNA Polymerase verwendet.

Klenow DNA Polymerase

Dieses Enzym wurde zum Auffüllen 5'-überhängender Enden verwendet.

Lösungen und Puffer:

dNTP-Mix (von Fermentas)	10 mM dATP/10 mM dGTP/10 mM dCTP/10 mM dTTP
5x Probenpuffer	siehe 2.2.3.F

Durchführung:

Für die Herstellung glatter Enden durch die Klenow DNA Polymerase (5 U/μl) wurden pro μg DNA 0,2-0,5 U Enzym sowie dNTPs in einer Endkonzentration von 50 μM zugegeben. Das Ganze wurde dann für 30 Minuten in einem 25°C warmen Wasserbad inkubiert. Es wurde dabei immer darauf geachtet, dass die Reaktionspuffer des vorausgegangenen Verdau mit den Reaktionsbedingungen für das Klenow-Enzym in Einklang standen. Im Anschluss folgte eine Phenolisierungs- und Fällungsreaktion (2.2.3.D), eine Dephosphorylierung (2.2.3.N) oder die Zugabe einer entsprechenden Menge 5x Probenpuffer.

T4 DNA Polymerase

Dieses Enzym wurde zum Abdauen 3'-überhängender Enden bzw. zum Auffüllen 5'-überhängender Enden verwendet.

Lösungen und Puffer:

dNTP-Mix (von Fermentas)	10 mM dATP/10 mM dGTP/10 mM dCTP/10 mM dTTP
5x Probenpuffer	siehe 2.2.3.F

Durchführung:

Für die Herstellung glatter Enden durch die T4 DNA Polymerase (3 U/μl) wurden pro μg DNA 1-2 U Enzym zugegeben und dNTPs in einer Endkonzentration von 100 μM zugesetzt. Das Ganze wurde dann für 15 Minuten in einem auf 12°C temperierten Wasserbad inkubiert. Es wurde dabei immer darauf geachtet, dass die Reaktionspuffer des vorausgegangenen Verdau mit den Reaktionsbedingungen für die T4 DNA Polymerase in Einklang standen. Im Anschluss wurde wie weiter oben erläutert verfahren.

L. Primer-Annealing

Wurden bei Klonierungen Sequenzen benötigt, die für HA- oder His-Epitope kodieren, so wurden diese z.T. als Oligonukleotide synthetisiert (ungefähr in einem Basenpaarbereich von 30-50 bp).

Puffer:

10x Annealing-Puffer	200 mM Tris-HCl pH 7,4/20 mM MgCl ₂ /500 mM NaCl
----------------------	---

Durchführung:

Eine Primer-Annealing-Reaktion enthielt jeweils 20 µg der zu hybridisierenden Oligonukleotide sowie 1/10 Volumenanteil des 10x Annealing-Puffers bezogen auf das Reaktionsvolumen (200 µl). Das Ganze wurde in ein Becherglas mit 100°C heißem Wasser gegeben (Heizplatten mit Magnetrührer MR 3001) und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Becherglas vom Heizblock genommen und zum langsamen Abkühlen der Reaktion mit Alufolie abgedeckt und ü.N. bei RT inkubiert. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Annealings wurden 1 µg des Hybridisierungsansatzes und entsprechende Mengen der verwendeten Einzelstrang-Oligonukleotide auf ein 2%iges Agarose-Gel (2.2.3.F) aufgetragen. War im Falle der annealten DNA-Proben eine deutlich stärker gefärbte Bande als bei den Einzelstrang-Proben zu erkennen, so wurde der Annealing-Mix auf ein 8%iges, präparatives Polyacrylamid-Gel (2.2.2.G) aufgetragen und der Elektroelution (2.2.3.H) unterzogen.

M. PCR-Reaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für die Amplifizierung von Insert-DNA (PCR für Klonierungen) bzw. zur Mutagenese von DNA (Mutagenese-PCR) herangezogen. Als PCR-Geräte wurden der Thermo-Cycler „My Cycler“ (BioRad) oder der „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf) verwendet.

PCR für Klonierungen

Die Amplifizierung von Insert-DNA erfolgte im Rahmen der für diese Arbeit generierten Konstrukte immer mit der sog. *Pfu* Polymerase (rekombinant aus *Pyrococcus furiosus*).

Lösungen und Puffer:

dNTP-Mix (von Fermentas)	siehe 2.2.3.K
--------------------------	---------------

10x <i>Pfu</i> -Puffer mit 20 mM MgSO ₄	von Fermentas bezogen
Aqua bidest	siehe auch 2.2 -> autoklavieren

Durchführung:

Für die PCR-Reaktion wurden zunächst folgende Reaktionen angesetzt:

Materialien:	Mix 1: 75 µl	Mix 2: 25 µl
10x <i>Pfu</i> -Puffer	7,5 µl	2,5 µl
Oligo 1 (1 µg/µl)	0,25 µl	-
Oligo 2 (1 µg/µl)	0,25 µl	-
dNTPs	-	5 µl
<i>Pfu</i> (2,5 U/µl)	-	1 µl
Template-DNA (100 ng/µl)	1 µl	-
Aqua bidest	66 µl	16,5 µl

Die PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Standardprogramm durchgeführt:

- I. 5 Minuten bei 95°C
 - II.
 1. 30 Sekunden bei 95°C
 2. 60 Sekunden bei einem Temperatur-Gradienten
 3. 2 Minuten bei 72°C pro 1000 bp (im Rahmen dieser Arbeit i. d. Regel 3 Minuten)
 - III. 10 Minuten bei 72°C
 - IV. ∞ bei 4°C
- } 34x wiederholt

Für eine Standard-PCR-Reaktion wurden zunächst 75 µl Mix 1 unter den in Schritt I genannten Bedingungen inkubiert. Danach wurde das PCR-Programm gestoppt und 25 µl Mix 2 zugegeben. Danach wurde mit dem Programm fortgefahren. Um eine geeignete Annealing-Temperatur zu finden, wurde bei II.2 in der Regel ein Temperatur-Gradient gefahren, der den Bereich von 5-25°C unter der angegebenen Hersteller-T_m umfasste. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden 5-10 µl jeder Reaktion auf ein Agarose-Gel (2.2.3.F) aufgetragen. Entsprachen die Banden-Intensitäten der erforderlichen Menge (2.2.3.J) bzw. waren die PCR-Produkte spezifischer Natur, so wurden alle geeigneten Ansätze zusammengefasst und einer Phenolisierungs- und Fällungsreaktion (2.2.3.D) unterzogen, die von einem Restriktionsverdau (2.2.3.J) gefolgt wurden.

Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR erfolgte im Rahmen der für diese Arbeit generierten Konstrukte immer mit der sog. *Pfu* Polymerase (rekombinant aus *Pyrococcus furiosus*).

Lösungen und Puffer:

dNTP-Mix (von Fermentas)	siehe 2.2.3.K
10x <i>Pfu</i> -Puffer mit 20 mM MgSO ₄	von Fermentas bezogen
Aqua bidest	siehe auch 2.2 -> autoklavieren

Durchführung:

Für die PCR-Reaktion wurden zunächst folgende Reaktionen angesetzt:

Materialien:	Mix: 50 µl
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl
Oligo 1 (1 µg/µl)	0,125 µl
Oligo 2 (1 µg/µl)	0,125 µl
dNTPs	1,5 µl
Aqua bidest	41,75 µl
Template-DNA (100 ng/µl)	0,5 µl
<i>Pfu</i> (2,5 U/µl)	1 µl

Die PCR-Reaktionen wurden auf Eis zusammenpipettiert, wobei die Polymerase als letztes zugefügt wurde. Die Reaktionen wurden nach dem folgenden Standardprogramm durchgeführt:

- I. 3 Minuten bei 95°C
- II.
 1. 30 Sekunden bei 95°C
 2. 60 Sekunden bei einem Temperatur-Gradienten
 3. 1 Minute/ kbp der Template Plasmid-Länge bei 68°C
(im Rahmen dieser Arbeit i. d. Regel 9 Minuten)
- III. ∞ bei 4°C

17x wiederholt

Um eine geeignete Annealing-Temperatur zu finden, wurde wie oben beschrieben verfahren. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden 5-10 µl jeder Reaktion abgenommen und für eine spätere Gelkontrolle aufbewahrt. Die restliche Reaktion wurde mit 2 µl *Dpn* I (20 U/µl) versehen und 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um die nicht mutierte DNA abzdauen. Anschließend wurden 5-10 µl der unverdauten und verdauten PCR-Reaktion auf ein 0,8%iges Agarose-Gel (2.2.3.F) aufgetragen. War nach der *Dpn* I-Behandlung eine Bande der zu erwartenden Plasmid- Molekulargewichtsgröße zu erkennen, die auf gleicher Höhe mit der Plasmid-Bande der unverdauten Reaktion lief, so konnte von einer erfolgreichen Mutagenese-PCR ausgegan-

gen werden. Anschließend wurden 3 µl der verdauten PCR-Reaktion in XL1-Blue (superkompetente) Zellen oder Sure-Zellen transformiert (2.2.1.D).

N. Dephosphorylierung von Vektor-DNA mittels bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP)

Puffer:

5x Probenpuffer	siehe 2.2.3.F
-----------------	---------------

Durchführung:

Um zu verhindern, dass präparativ verdaute Vektor-DNA religiert, wurde diese mit BAP dephosphoryliert. Hierfür wurden im Anschluss an den letzten Verdauschritt 75 U Enzym pro 10 µg Vektor-DNA in den Ansatz pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass der zuvor verwendete Enzym-Reaktionspuffer mit den Reaktionsbedingungen der BAP im Einklang stand. Das Ganze wurde für 30 Minuten bei 65°C inkubiert (Heizblock VLM LS 1) und anschließend für 10 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329), um gebildetes Kondenswasser der Reaktion zurückzuführen. Anschließend wurde die Proben erneut für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit einer entsprechenden Menge 5x Probenpuffer gestoppt und auf ein 1%iges, präparatives Agarosegel geladen (2.2.3.F).

O. Ligation

Puffer:

10x Reaktionspuffer	von NEB bezogen
A. bid.	siehe auch 2.2 -> autoklavieren

Durchführung:

Je nach zur Verfügung stehender DNA-Menge wurden für eine Ligrationsreaktion 20-150 ng elektroelierter Vektor-DNA (2.2.3.M) verwendet. Die Menge der Insert-DNA errechnete sich dabei wie folgt:

Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden

Hierbei sollte das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-Menge ca. **1:5** sein.

$$\text{Menge der eingesetzten Vektor-DNA in ng} \times \frac{\text{Größe der Insert-DNA in bp} \times 5}{\text{Größe der Vektor-DNA in bp}}$$

Ligation von glatten Enden

Hierbei sollte das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-Menge ca. **1:10** sein.

$$\text{Menge der eingesetzten Vektor-DNA in ng} \times \frac{\text{Größe der Insert-DNA in bp} \times 10}{\text{Größe der Vektor-DNA in bp}}$$

Gemäß den weiter oben ausgeführten Berechnungen wurden entsprechende Mengen an Vektor- und Insert-DNA zusammenpipettiert. Anschließend wurden jeweils 1 µl Ligase (400 U/µl) und 1 µl 10x Reaktionspuffer dazugegeben, wobei das Ganze auf ein Endvolumen von 10 µl mit A. bid. aufgefüllt wurde. Die Ligationsreaktion wurde dann ü.N. im Kühlraum in einem auf 15-17°C temperierten Wasserbad inkubiert.

P. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte bei MWG Biotech (Martinsried). Hierfür wurden 1,5 µg Plasmid-DNA einer Midi-Präparation (2.2.3.B) in einem Eppendorf-Gefäß bei 37°C eingetrocknet (Inkubationsschrank Kelvitron t). Wurde ein Sequenzier-Primer benötigt, so musste dieser in einem Volumen von 50 µl (in A. bid.) und einer Konzentration von 10 pmol/µl mitgeschickt werden.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

Vorbemerkung: Die Lagerung von Proteinen erfolgte bei -80°C, wenn nicht anders angegeben.

A. Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach Bradford (1976)

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Roti®Quant-Konzentrat nach Vorschrift verdünnt und die Extinktion bei 590 nm und 450 nm im Vergleich zu BSA Standard-Werten gemessen. Der Bradford-Assay beruht auf der unspezifischen Wechselwirkung des Coomassie Brilliant-Blue-Farbstoffs G 250 mit kationischen und nicht-polaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine. Erwähnenswert hierbei ist insbesondere die Wechselwirkung mit Arginin. Nicht so bedeutend hingegen sind die Wechselwirkungen mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Lösungen und Puffer:

BSA-Eichlösungen	BSA in folgenden Konzentrationen: 0/0,1/0,25/0,5/1,5 und 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Roti®Quant (von Roth)	1:5 Verdünnung des Konzentrates
Aqua bidest	siehe 2.2

Durchführung:

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration musste zunächst eine Eichkurve erstellt werden. Hierzu wurden je 10 μl der oben genannten BSA-Eichlösungen in je 1 ml der verdünnten Roti®Quant-Lösung gegeben und gut gemischt. Anschließend wurden die zu vermessenden Proteinlösungen in je 1 ml der Coomassie-Lösung gegeben und ebenfalls gemischt. Handelte es sich um Säuger-Zellysate (2.2.2.G), so wurden 1 bis max. 5 μl Probenvolumen in die Messung eingesetzt, handelte es sich um aufgereinigte Proteine (2.2.4.E und F), so schwankte die für die Messung eingesetzte Probenmenge zwischen 0,5 und 20 μl . Als Negativ-Kontrollen wurden immer zeitgleich identische Volumina an Probenpuffer gemessen. Die Proben wurden anschließend für 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden alle Proben bei 590 nm und 450 nm am Spektralphotometer („U-2000“) vermessen, wobei immer gegen Aqua bidest geeicht wurde. Zunächst wurde bei allen Messproben der Quotient (A_{590}/A_{450}) aus den Absorptionswerten bei 590 nm und 450 nm ermittelt. Im Anschluss daran wurde die Eichkurve erstellt. Hierzu wurde der bei 0 μg BSA ermittelte Quotient (A_{590}/A_{450}) von allen anderen Eichkurven-Werten (1-50 μg BSA) subtrahiert, wodurch man die sog. korrigierten Quotienten (korr. A_{590}/A_{450}) erhielt. Danach wurden die Proteinmengen der jeweiligen Standard-Proben (1-50 μg) durch die entsprechenden „korr. A_{590}/A_{450} -Werte“ dividiert und die so erhaltenen Werte gemittelt (= Mittelwert). Um nun die Konzentrationen der Messproben zu erhalten, wurde zunächst auch hier der bei 0 μg BSA erhaltene Quotient (A_{590}/A_{450}) von den ermittelten Quotienten (A_{590}/A_{450}) der jeweiligen Messproben abgezogen, woraus sich wiederum die sog. korrigierten Quotienten (korr. A_{590}/A_{450}) ergaben. Diese wurden nun zur Ermittlung der Proteinmenge pro eingesetztem Messvolumen mit dem aus den BSA-Standardwerten errechneten Mittelwert multipliziert. Die Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erhielt man schließlich, indem man die so erhaltenen Werte durch das zur Messung eingesetzte Probenvolumen dividierte. Da in der Regel die Probenpuffer identische Absorptionswerte zu den Absorptionswerten bei 0 μg BSA zeigten, konnte auf eine Korrektur der ermittelten Proteinkonzentrationen verzichtet werden.

Nach Absorptionsspektrum

Im Vergleich zu der kolorimetrischen Proteinbestimmung nach Bradford beruht diese spektroskopische Methode auf der Vermessung der spektralen Absorptionseigenschaften von Proteinen in einem Strahlengang, bei einem definierten Wellenlängenspektrum. Im Vergleich zu kolorimetrischen Methoden sind spektroskopische Methoden im allgemeinen unempfindlicher und benötigen daher höhere Konzentrationen an Protein (Lottspeich und Zorbas, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich das aufgereinigte, „His-freie Proteinprodukt“ von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796) (2.1.9.A und 3.4.3.A) auf diese Weise vermessen. Hierfür wurden eine Proteinlösung und das entsprechende, Protein-freie Lösungsmittel zunächst für 5 Minuten bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Danach wurden 100 µl vom Überstand der Proteinlösung in eine Quarzküvette QS 1.000 (schwarz; 100 µl, Schichtdicke und Zentrum jeweils 10 mm) überführt. Anschließend wurde mit dem Spektralphotometer („U-2000“) bei RT ein Absorptionsspektrum der Messlösung in einem Wellenlängenbereich von 240-340 nm aufgezeichnet, wobei das Spektralphotometer zuvor mit einem identischen Volumen an Protein-freiem Lösungsmittel (Referenz) in der gleichen Quarzküvette „auf Null“ gestellt wurde. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein (Disulfidbrücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von 250-300 nm. Nach Pace et al. (1995) kann man aus der Aminosäuresequenz den molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ_{280}) und daraus bei bekanntem Molekulargewicht den spezifischen Extinktionskoeffizienten ($^{0,1\%}A_{280}$) berechnen:

I. Zunächst wird der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ermittelt:

$$\epsilon_{280} = \sum \text{Tryptophan} \times 5500 + \sum \text{Tyrosin} \times 1490 + \sum \text{Cystein} \times 125$$

$$\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ für „His-freies Proteinprodukt“ von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796)}$$

II. Anschließend wird der spezifische Extinktionskoeffizient $^{0,1\%}A_{280}$ (cm^2/mg)

ermittelt:

$$^{0,1\%}A_{280} = \epsilon_{280} : M_r \qquad M_r \text{ (= Molekulargewicht in g/mol)}$$

$$^{0,1\%}A_{280} = 0,319 \text{ cm}^2/\text{mg} \text{ für „His-freies Proteinprodukt“ von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2C(680-796)}$$

III. Danach kann die Proteinkonzentration durch Einsetzen in das Lambert-Beersche-Gesetz erfolgen:

$$A_{280} = c \cdot d \cdot ^{0,1\%}A_{280}$$

c = Proteinkonzentration

d = Schichtdicke der Küvette: 1 cm

$$c = A_{280} \cdot d^{-1} \cdot (^{0,1\%}A_{280})^{-1}$$

Das Absorptionsmaximum des Proteins sollte sich bei 280 nm befinden. Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm detektiert werden, da dies auf eine durch Aggregatbildung hervorgerufene Lichtstreuung hindeutet.

B. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Bei der SDS-Page wurden Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im Rahmen der Arbeit wurden 8-20%ige, denaturierende SDS- Polyacrylamid-Gele benutzt.

Lösungen und Puffer:

AA/BA-Lösung	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (w/w): Rotiphorese Gel 30-Lösung (von Roth)
4x Lower Tris	1,5 M Tris-HCl pH 8,8/0,4% SDS
4x Upper Tris	0,5 M Tris-HCl pH 6,8/0,4% SDS
5x SDS-Probenpuffer	312,5 mM Tris-HCl pH 6,8/50% Glycerin/6,25% SDS/0,00625% (w/v) Bromphenolblau/12,5% β -Mercaptoethanol
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
APS	10% (w/v) in H ₂ O (\leq 1 Monat bei 4°C lagern)
10x Laufpuffer	0,25 M Tris/1,9 M Glycin/1% SDS
Geltypen: vertikale Gele	14 cm x 12 cm x 1,5 mm: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System SE 600 Series Electrophoresis Unit (Hofer) 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System, Mini Protean® II Electrophoresis Cell (Biorad)
Molekulargewichtsstandard: Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB)	175 kDa (MBP- β -Galaktosidase), 83 kDa (MBP-Paramyosin), 62 kDa (Glutamic Dehydrogenase), 47,5 kDa (Aldolase), 32,5 kDa (Triosephosphat Isomerase), 25 kDa (β -Lactoglobulin A), 16,5 kDa (Lysozym), 6,5 kDa (Aprotinin) 15 μ l geladen bei Gelgröße 14 cm x 12 cm x 1,5 mm; 8 μ l geladen bei Gelgröße 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm

Durchführung:

10%ige Trenngele (14 cm x 12 cm x 1,5 mm) enthielten in einem Endvolumen von 28 ml:

AA/BA-Lösung (30%/0,8%)	9,3 ml
4x Lower Tris	7,0 ml
A. bid.	11,6 ml
TEMED	16 μ l
APS	78 μ l

4%ige Sammelgele (14 cm x 12 cm x 1,5 mm) enthielten in einem Endvolumen von 10 ml:

AA/BA-Lösung (30%/0,8%)	1,3 ml
4 x Upper Tris	2,5 ml
A. bid.	6,1 ml
TEMED	10 µl
APS	50 µl

Zunächst wurden die Glasplatten, Spacer und Probenkämme gewaschen und mit 96%igem Ethanol zusätzlich gereingt. Nach gutem Durchmischen der Gellösung wurde diese luftblasenfrei in die Vorrichtung gegossen und sofort vorsichtig mit A. bid. überschichtet. Nach 60 Minuten Polymerisationszeit wurde das überschüssige Wasser abgenommen, das Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingesteckt. Nach ungefähr 50 Minuten waren die Gele gebrauchsfertig. Die zu analysierenden Proben wurden mit fünffach konzentriertem SDS-Probenpuffer oder entsprechenden Verdünnungen davon auf eine Endkonzentration von 1x SDS gebracht. Je nach zu analysierender Probe wurden die Proben anschließend für 5 Minuten bei 100°C denaturiert oder 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach konnten die Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese für die Gelgröße 14 cm x 12 cm x 1,5 mm erfolgte bei 500 V oder 10 V ü.N. unter Kühlung (10°C). Für den Geltyp 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm hingegen erfolgte die Elektrophorese ohne Kühlung bei RT und 120 V. Danach wurden die Gele einer Coomassie-Färbung (2.2.4.C) oder einem Western-Blot (2.2.4.D) unterzogen. Die Abschätzung der Proteingrößen erfolgte über den Abgleich mit dem aufgetragenen Marker.

C. Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Lösungen:

Färbelösung	0,25% Coomassie Brilliant Blau R 250/50% Methanol/10% Essigsäure
Entfärbelösung	50% Methanol/10% Essigsäure

Durchführung:

Ein Gel der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm wurde 40 Minuten in einer Schale mit Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Für ein Gel der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm hingegen waren 10 Minuten ausreichend. Danach wurde die Färbelösung entfernt und die Gele wurden in Entfärbelösung gegeben. Durch mehrmaliges Wechseln (6-8 mal) konnte so der Hintergrund entfärbt werden. Das Gel wurde zur Dokumentation gescannt (DUOSCAN f40).

D. Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)

Beim Western-Blot erfolgte der Transfer der Proteine aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße Immobilon-P Transfermembran). Vor Verwendung musste die PVDF-Membran zunächst für 60 Sekunden mit Methanol benetzt werden und dann für 20 Minuten in den jeweiligen Transferpuffer (abh. von Blot-Verfahren, siehe weiter unten) überführt werden.

Tank-Blotten

Mit dieser Methode wurden in der Regel Gele der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm geblottet.

Puffer:

Transferpuffer	50 mM Tris/384 mM Glycin/20% Methanol/0,01% SDS
----------------	---

Durchführung:

Zum Aufbau des Blots wurde auf die später der Anode zugewandten Seite des Trägers der Blot-Vorrichtung zunächst ein in Transferpuffer getränktes Schaumstoffpolster gelegt. Darauf folgten 3 Lagen ebenfalls in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieres (auf Gelgröße zugeschnitten). Die Membran (auf Gelgröße zugeschnitten) wurde aufgelegt und darauf das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel, welches für 3-4 Minuten in Transferpuffer gelegt worden war. Nach vorsichtigem Herausdrücken von Luftblasen wurden nochmals 3 Lagen in Transferpuffer getränkter Whatman-Papiere und ein in Transferpuffer getränktes Schaumstoffpolster gelegt. Nach mehrmaligem Vor- und Zurückrollen eines Glasstabes über den Stapel zum Entfernen von störenden Luftblasen zwischen Gel und Membran wurde der Träger geschlossen und in die mit Transferpuffer gefüllte Blotvorrichtung gestellt. Der Transfer (Western-Transferkammer „TE 62“) erfolgte bei 1 A unter ständiger Kühlung (10°C) und bei stetigem Umwälzen des Transferpuffers mittels eines Magnetstabes für 3 Stunden.

Semidry-Verfahren

Mit dieser Methode wurden in der Regel Gele der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm geblottet.

Puffer:

Transferpuffer	25 mM Tris/192 mM Glycin/0,02% SDS/20% Methanol
----------------	---

Durchführung:

Auf die Anoden-Platte wurden zunächst 3 Lagen in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieres (auf Gelgröße zugeschnitten) gelegt, dann folgte die Membran. Im Anschluß wurde das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel, welches zuvor für 10 Minuten in Transferpuffer gelegt worden war, aufgelegt. Nach vorsichtigem Herausdrücken von Luftblasen wurden nochmals 3 Lagen in Transferpuffer getränkter Whatman-Papiere eingelegt. Nach mehrmaligem Vor- und Zurückrollen eines Glasstabes über den Stapel zum Entfernen von störenden Luftblasen zwischen Gel und Membran wurde die Kathoden-Platte aufgelegt. Der Transfer (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell) erfolgte unabhängig von der Anzahl der zu blottenden Gele immer bei 24 V für 1 Stunde (ohne Kühlung).

Nach dem Blotten wurde unabhängig vom Blot-Verfahren folgendermaßen vorgegangen:

Lösungen und Puffer:

1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B)
Blocklösung	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 5% Magermilchpulver/0,2% Tween 20
Antikörper-Lösung	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 3% Magermilchpulver/0,2% Tween 20
Waschlösung	1:10 Verdünnung von 10x PBS (2.2.2.B) + 0,2% Tween 20
A. bid.	siehe auch 2.2
Western Lightning Chemoluminescence Reagent von Perkin Elmer	kurz vor der Verwendung je 1 Volumenteil der beiden Lösungen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen geben und gut mischen

Durchführung:

Zunächst wurden nach dem Blotten auf der Rückseite der Membran die Markerbanden mit einem Bleistift nachgezeichnet. Danach wurde die Membran entweder für 1 Stunde bei RT oder ü.N. bei 4°C in der Blocklösung auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation der Membran (auf dem Schüttler) bei RT für 1 Stunde in der Primärantikörperlösung (Verdünnung siehe 2.1.7.A). Danach wurde die Membran für 2x 5 Minuten und 3x 10 Minuten mit der Waschlösung gewaschen (auf dem Schüttler). Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran (auf dem Schüttler) für 1 Stunde bei RT mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, der wiederum in der entsprechenden Verdünnung (siehe auch 2.1.7.B) in der Antikörper-Lösung vorlag. Danach wurde die Membran wieder für 2x 5 Minuten und 3x 10 Minuten mit der Waschlösung gewaschen, gefolgt von zwei 5-minütigen Waschschritten in 1x PBS und drei 5-minütigen Waschschritten in A. bid (auf dem Schüttler). Nach Abgießen

des Wassers wurden auf Membranen der Größe 14 cm x 12 cm 10 ml, auf Membranen der Größe 8 cm x 4 cm hingegen 4 ml des entsprechend angesetzten Chemoluminiszenz-Reagenz gegeben. Die Membranen wurden für 1 Minute in dieser Lösung geschwenkt, danach kurz auf Whatman-Papier abgetropft und dann luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie gelegt. Diese wurde in eine Film-Kassette [Universal 100 (35,6 x 43,2 cm)] überführt. Die Detektion der Banden erfolgte in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Röntgenfilms, wobei je nach Banden-Intensität zwischen 1 Sekunde und ü.N. exponiert wurde. Nach der Exposition wurde der Film für 5-10 Minuten (abhängig von Signalstärke) in Eukobrom-Entwickler gegeben und nach einem kurzen Schwenken in Wasser mit Acido Fixer fixiert (15 Minuten). Nach ausgiebigem Abspülen des Filmes wurde dieser bei RT getrocknet. Um die Position der Markerbanden sicher auf die getrockneten Filme übertragen zu können, wurden fluoreszierende Glogos Autorad Marker auf die Klarsichtfolie geklebt. Sollte eine Membran mit einem weiteren Primäran-tikörper einer anderen Spezies behandelt werden, so wurde die Membran nach der letzten Film-Exposition aus der Hülle genommen und 3x für 5 Minuten in A. bid. inkubiert (auf dem Schüttler). Danach wurde die Membran 5 mal für 10 Minuten mit der Waschlösung gewaschen (auf dem Schüttler). Im Anschluss wurde die Membran ü.N. in Blocklösung gegeben, in die zusätzlich Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,02% gegeben wurde. Danach konnte wieder wie oben beschrieben verfahren werden.

E. Aufreinigung von Proteinen über Nickel-Säulen

Puffer:

A. bid.	siehe auch 2.2
Ladepuffer	50 mM NiSO ₄
Bindungspuffer	siehe auch 2.2.1.E
Waschpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,9/60 mM Imidazol/500 mM NaCl/0,1% Triton X-100
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0/1 M Imidazol oder 10 mM EDTA/500 mM NaCl/0,1% Triton X-100
Strip-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0/100 mM EDTA/500 mM NaCl

Durchführung:

Zur Aufreinigung von His-fusionierten Proteinen wurden Chromatographie-Säulen (Fassungsvolumen: 10 ml) aus Plastik in Kombination mit dem sog. „His Bind Resin“-Kit der Firma Novagen verwendet, dessen Bindekapazität 10 mg Protein pro ml Säulenbett betrug. Je nach zu erwartender Proteinmenge wurde eine entsprechende Menge an Bead-Material in die Säulen gefüllt, wobei pro 1,5 ml-Säulenbett nie mehr als 40 ml Lysat geladen wurde, um ein

Verstopfen selbiger zu verhindern. Alle Arbeiten wurden – wenn nicht anders angegeben - bei RT durchgeführt, wobei bei Proben für die Quarzmikrowaagen-Analyse (2.2.4.K) auf die Verwendung von Triton X-100 in allen Puffern verzichtet wurde. Bevor das aufzureinigende Lysat (2.2.1.E) jedoch geladen werden konnte, wurden die Beads zunächst mit 5 Säulenvolumina A. bid. und 10 Säulenvolumina Ladepuffer (zum Aufbringen der Nickel-Ionen) vorbehandelt. Danach wurde das Säulenmaterial mit 5 Säulenvolumina Bindungspuffer äquilibriert. Nach Laden des Lysates (Durchfluss wurde immer zur Sicherheit gesammelt) wurde mit 15 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die fraktionsweise Proteinelution mit einem halben Säulenvolumen Elutionspuffer, welcher Imidazol in einer Endkonzentration von 1 M enthielt. In der Regel wurden bis zu 10 Fraktionen gesammelt, wobei das Elutionsprofil mittels Bradford-Assay (2.2.4.A) der gesammelten Fraktionen dokumentiert wurde. Im Falle des Proteinproduktes von pET21b/PKD1C (2.1.8.A) wurde die Aufreinigung bei 4°C durchgeführt, wobei bei der Elution jeweils das einfache Säulenvolumen an Elutionspuffer in die Sammelröhrchen vorgelegt wurde, um ein Präzipitieren des Proteins zu verhindern (3.3.2.A). Für die Elution des Proteinproduktes von pET21b/PIGEA-14 (2.1.8.A) wurde anstelle von 1 M Imidazol 10 mM EDTA in den Elutionspuffer gegeben, da dies ein Präzipitieren des Proteins bei den späteren Dialyseschritten (3.3.2.B) verhinderte. Nach der Elution wurden die Proteinproben entweder einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.4.B) oder Dialyse (2.2.4.G) unterzogen. Für die Regenerierung des Säulenmaterials wurden die Beads nach der Elution mit 10 Säulenvolumina A. bid. und 5 Säulenvolumina Strip-Puffer behandelt, in dem sie bei 4°C gelagert wurden.

F. Aufreinigung von Proteinen über Amylose-Säulen

Materialien:

A. bid.	siehe auch 2.2
Bindungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4/200 mM NaCl/1 mM EDTA pH 8,0 (2.2.1.E)
Waschpuffer	siehe auch Bindungspuffer
Elutionspuffer	siehe auch Bindungspuffer + 10 mM Maltose
SDS-Lösung	0,1% SDS

Durchführung:

Zur Aufreinigung von MBP-fusionierten Proteinen wurden Chromatographie-Säulen (Fassungsvolumen: 10 ml) aus Plastik in Kombination mit dem sog. „Amylose Resin“-Kit der Firma NEB verwendet, dessen Bindekapazität 3 mg Protein pro ml Säulenbett betrug. Je nach zu erwartender Proteinmenge wurde eine entsprechende Menge an Bead-Material in die Säulen-

len gefüllt, wobei pro 1,5 ml-Säulenbett nie mehr als 40 ml Lysat geladen wurde, um ein Verstopfen selbiger zu verhindern. Alle Arbeiten wurden – wenn nicht anders angegeben - bei RT durchgeführt. Bevor das aufzureinigende Lysat (2.2.1.E) jedoch geladen werden konnte, wurden die Beads zunächst mit 3 Säulenvolumina A. bid. gewaschen und mit 5 Säulenvolumina Bindungspuffer äquilibriert. Nach Laden des Lysates (Durchfluss wurde immer zur Sicherheit gesammelt) wurde mit 15 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte entweder die fraktionsweise Proteinelution mit einem halben Säulenvolumen Elutionspuffer, welcher Maltose in einer Endkonzentration von 10 mM enthielt, oder wie im Falle des Proteinproduktes von pMAL-c2/PKD2C (2.1.8.A), die Abspaltung von MBP (2.2.4.I). In der Regel wurden bis zu 10 Fraktionen gesammelt, wobei das Elutionsprofil mittels Bradford-Assay (2.2.4.A) der gesammelten Fraktionen dokumentiert wurde. Nach der Elution wurden die Proteinproben entweder einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.4.B) oder Dialyse (2.2.4.G) unterzogen. Für die Regenerierung des Säulenmaterials wurden die Beads nach der Elution mit 3 Säulenvolumina A. bid., 3 Säulenvolumina 0,1%iger SDS-Lösung, 3 Säulenvolumina A. bid. und 3 Säulenvolumina 20%igem Ethanol behandelt, in dem sie bei 4°C gelagert wurden.

G. Dialyse von Proteinlösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Dialyse von Proteinlösungen sog. Slide-A-Lyzer Dialysekassetten der Firma Pierce mit einer Ausschlussgröße von 3,5 kDa und einer Glycerin-freien Membran aus regenerierter Zellulose verwendet. Je nach Probenvolumen konnten Kassetten mit einem Fassungsvermögen von 100-500 µl, 1-3 ml und 3-12 ml verwendet werden. Vor Gebrauch mussten die Kassetten für 30-60 Sekunden mit dem jeweiligen Dialysepuffer benetzt werden. Danach konnte die Proteinlösung durch eine von vier im Kassettenrahmen befindlichen Öffnungen eingespritzt werden (Kanülen: 21 G x ½), wobei das überschüssige Luftvolumen mit der Spritze aufgezogen wurde. Auf diese Weise wurde erreicht, dass eine größtmögliche Kontaktfläche zwischen Membran und zu dialysierender Lösung geschaffen wird, wodurch ein schnelleres Umdialysieren als mit den üblicherweise verwendeten Schläuchen gewährleistet wird. Danach wurden die Kassetten in einen Halter für Slide-A-Lyzer gesteckt und in ein 500 ml Becherglas mit 500 ml Dialysepuffer gegeben, wobei der Puffer üblicherweise nach 1½, 3 und weiteren 12 Stunden (letzter Schritt meist ü.N.) gewechselt wurde. Die Dialyse fand immer bei 4°C und bei ständigem Umwälzen des Puffers statt. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung aus der Kassette entnommen, indem ein zu dem dialysierten

Probenvolumen identisches Volumen an Luft eingespritzt wurde, und das Probenvolumen mit der Spritze aufgezogen wurde. Danach wurden die Proben je nach Probenvolumen 5 Minuten bei 4500 rpm (Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454) oder 14000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) bei 4°C abzentrifugiert, um möglicherweise präzipitiertes Protein oder Calcium (siehe weiter unten) abzutrennen. Die Überstände wurden dann einer Bradford-Bestimmung unterzogen (2.2.4.A). Um mittels eines SDS-Polyacrylamid-Gels (2.2.4.B) abschätzen zu können, wieviel Protein im Verlauf der Dialyse präzipitierte, wurden die Pellets in 1x SDS-Probenpuffer gelöst, wobei das Volumen identisch zu dem Volumen der entsprechenden Überstands-Proben vor bzw. nach der Dialyse war.

Sonderfälle:

- ❖ Sollte wie im Falle des „His-freien Proteinproduktes“ von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796) (2.1.8.A) ein möglichst Calcium-freies Protein nach der Dialyse für die Fluoreszenzspektroskopiemessungen (2.2.4.J) vorliegen, so wurden alle benötigten Gegenstände mit Chelex-Beads behandeltem A. bid. (2.2) gewaschen und die Dialyse fand in Plastik-Bechergläsern statt. Weiterhin wurde der Dialysepuffer mit Chelex-Beads behandeltem A. bid. angesetzt und in Plastikgefäßen gelagert. Um möglichst viel Calcium zu entfernen, wurde über 3 Tage gegen „Calcium-freien“ Puffer dialysiert, wobei insges. 12 Mal ein Pufferwechsel in zeitlichen Abständen von 4 bzw. 12 Stunden (= ü.N.) vorgenommen wurde.
- ❖ Im Falle des Proteinproduktes von pET21b/PKD1C (2.1.8.A) musste das Nickel-Säuleneluat zur Vermeidung von Präzipitation zunächst 2x gegen 20 mM Tris-HCl pH 8,0/1 M Imidazol/10 mM EDTA/500 mM NaCl dialysiert werden. Danach erfolgte ein zweifacher Pufferwechsel mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0/10 mM EDTA/500 mM NaCl, der von einem vierfachen Pufferwechsel mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl gefolgt wurde. Die Intervalle zwischen den Pufferwechseln betragen 4 bzw. 12 Stunden (= ü.N.).

Die Konzentrationen und Lagertemperaturen, welche für die im Rahmen der Arbeit verwendeten Proteine nötig waren, sind unter 3.3 und 3.4 zu finden.

H. Konzentrieren von Proteinlösungen über Ultrafiltration

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgereinigte Proteinlösungen mittels Ultrafiltrationsröhrchen ankonzentriert. Hierzu wurde die Proteinprobe in eine Filtereinheit aus regenerierter Zellulose oder Polyethersulfon gegeben, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Filtermembran-Porengröße mit dem Molekulargewicht des Zielproteins in Einklang zu bringen ist. Im Rahmen der Arbeit wurden immer Röhrchen mit einer Ausschlussgröße von ≤ 5 kDa gewählt. Durch Zentrifugation gelangt der überschüssige Puffer in ein Sammelgefäß, in das die Filtereinheit zuvor gesteckt wurde. Das Zielprotein verbleibt in der Filtereinheit und wird dadurch ankonzentriert. Durch die genannten Filtermembranmaterialien bleiben nur bis zu 5% des eingesetzten Proteins an der Membran haften. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass sich die Salzkonzentrationen, die bekanntlich einen großen Einfluss auf die Proteinlöslichkeit haben können (Lottspeich und Zorbas, 1998), nicht ändern. Bei Probenvolumina bis zu 10 ml wurden die 2 ml fassenden Säulen von Vivascience gewählt, bei Probenvolumina ab 10 ml und größer wurden die Millipore-Säulen verwendet. Bei den Säulen von Vivascience konnte auf ein Volumen bis zu 25 μ l ankonzentriert werden, bei den Säulen der Firma Millipore auf ein Volumen von ca. 200 μ l. Beide Säulen konnten bei Wahl eines geeigneten Gegengewichtes in einer Zentrifuge mit Ausschwing-Rotor (Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454) eingesetzt werden. In der Regel wurden die Röhrchen bei einer Temperatur von 4°C und maximal 4000 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454). Vor Einpipettieren der Proteinlösung wurden die Röhrchen mit dem vierfachen Fassungsvermögen an Probenpuffer äquilibriert. Je nach Ankonzentrierungsgeschwindigkeit wurden die Zentrifugläufe in Zeitintervallen von 1-10 Minuten unterbrochen, um die aktuelle Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (2.2.4.A) zu bestimmen.

I. Abspaltung von Epitopen mittels Endoproteasen

Bei den im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Endoproteasen handelt es sich um biotinyliertes Thrombin (1 U/ μ l) bzw. die His-fusionierte HRV 3C Protease (2 U/ μ l) von der Firma Novagen. Die Spaltreaktionen wurden entweder in Lösung oder mit an Säulen-Beads immobilisierten Proteinen durchgeführt. Zur Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen wie Zeitdauer, Temperatur, Verdauvolumen oder Enzym/Protein-Verhältnis wurden mehrere Versuchsreihen (in Lösung) durchgeführt, die sich an den jeweiligen Optimierungsprotokollen des Herstellers orientierten. Zur Visualisierung wurden die Verdaureaktionen auf SDS-

Polyacrylamid-Gele (2.2.4.B) aufgetragen, die im Anschluss mit Coomassie gefärbt wurden (2.2.4.C).

Spalten auf der Säule

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Proteinprodukt von pMAL-c2/PKD2C (2.1.8.A) auf Amylose-Beads immobilisiert, um mittels der HRV 3C Protease das N-terminale fusionierte MBP zu entfernen.

Puffer:

Spaltpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl
-------------	-----------------------------------

Durchführung:

Zunächst wurde Bakterienlysate (2.2.1.E) von 300 ml LB-Kultur von Rosetta(DE3)pLysS-Zellen benötigt, die mit pMAL-c2/PKD2C transformiert waren (Kulturbedingungen siehe auch 3.3.2.C; es sollte eine OD von ~3,0 erreicht werden). Das Lysat wurde wie unter 2.2.4.F beschrieben auf eine Amylose-Säule (0,5 ml reine Beads) geladen. Nach dem Waschschrift (2.2.4.F) wurden die Beads mit 12 Säulenvolumina Spaltpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die Beads in 5 ml Spaltpuffer aufgenommen. Danach wurden 100 U der HRV 3C Protease zugegeben, wobei die Bead-Suspension auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt wurde, die wiederum auf der Platte eines 37°C-Schüttelinkubators mit 100 rpm (Inkubationsschüttler Unitron) über Nacht mit Klebeband fixiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Bead-Suspensionen 1 Minute bei RT und 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Die Überstände wurden anschließend zusammengefasst und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das 0,25 ml (reine) Nickel-Beads enthielt, welche zunächst wie unter 2.2.4.E äquilibriert wurden und anschließend mit 5 Säulenvolumina Spaltpuffer behandelt wurden. Das Ganze wurde für 30 Minuten bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Beads 5 Minuten bei RT und 4500 rpm (Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, da er hauptsächlich MBP enthielt und ungefähr 70% von PC2C mit den Nickel-Ionen in Wechselwirkung traten. Nach einem Waschschrift mit 20 ml Spaltpuffer (zur Entfernung von MBP) wurde PC2C mit 30 mM bzw. 60 mM Imidazolschritten (in Spaltpuffer) eluiert, wobei pro Imidazolschritt 5 Fraktionen mit je 0,125 ml Volumen gesammelt wurden. Die Imidazol-Fraktionen von PC2C zeigten zwar noch leichte Kontaminationen durch MBP (vor allem bei 30 mM Imidazol), sie waren jedoch kontaminationsfrei im Hinblick auf die His-markierte Protease. Letztere war im Western-Blot (2.2.4.C) nur in den Fraktionen mit 1 M Imidazol (je 0,125 ml Volumen) zu de-

tektieren, die im Anschluss an den 60 mM Imidazolschritt gesammelt wurden. Anschließend wurden die 30 mM und 60 mM-Imidazolfraktionen von PC2C vereinigt und auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Das Protein wurde anschließend zu Amylose-Beads (0,125 ml reine Beads) gegeben, die zuvor wie unter 2.2.4.G beschrieben äquilibriert wurden und dann mit 3 Säulenvolumina Spaltpuffer behandelt wurden. Dieser Schritt diente zur Abtrennung der trotz Säulenspaltung nicht vollständig vermeidbaren (leichten) MBP-Kontamination. Das Ganze wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 30 Minuten bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Beads bei RT und 13000 rpm für eine Minute abzentrifugiert (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Der Überstand wurde aufgehoben. Um das zwischen den Beads verbliebene PC2C nicht zu verlieren, wurden die Beads mit 250 µl Spaltpuffer resuspendiert, bei RT und 13000 rpm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand auf Eis gestellt (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329). Das Ganze wurde noch dreimal wiederholt. Danach wurden der Überstand und die vier 250 µl-Fractionen zusammengefasst und zur Überprüfung der Reinheit der Proteinlösung bezüglich MBP auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.4.B) aufgetragen, das mit Coomassie gefärbt wurde (2.2.4.C). Es blieb immer eine leichte Rest-Kontamination von MBP, die jedoch vernachlässigbar ist (Protein ist auf jeden Fall zu 95% rein). Bei Bedarf kann der Amylose-Säulenschritt beliebig oft wiederholt werden. Auf diese Weise konnten ungefähr 1,5 mg PC2C (AS 680-968) gewonnen werden.

Spalten in Lösung

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde bei den Proteinprodukten von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796) und pET47b/PKD2(797-980) (2.1.8.A) in Lösung das N-terminale His-Epitop mittels Thrombin bzw. HRV 3C Protease entfernt.

Puffer:

Spaltpuffer f. Thrombin	20 mM Tris-HCl pH 8,4/150 mM NaCl/2,5 mM CaCl ₂
Spaltpuffer f. HRV 3C Protease	50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl

Durchführung:

Bevor mit der Spaltung in Lösung begonnen wurde, wurden Eluatfraktionen von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796) nach der Nickel-Säule in Spaltpuffer für Thrombin und solche von pET47b/PKD2(797-980) in Spaltpuffer für die HRV 3C Protease dialysiert (2.2.4.G):

- ❖ *pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796)*: Nach der Dialyse in Spaltpuffer wurde das Fusionsprotein nach folgendem Schema verdaut: 100 µg Protein in 500 µl Spaltpuffer mit 0,3 U (= 0,3 µl) Protease. Am Beispiel einer präparativen Aufreinigung soll weiterverfahren werden. Nach einem ü.N.-Verdau von 30 mg Protein in 150 ml Volumen mit 90 µl Enzym wurde die Reaktion mit 2,8 ml Streptavidin-Beads (32 µl pro 1 U Protease) behandelt, um biotinyliertes Thrombin zu entfernen. Danach wurde das Ganze bei 4500 rpm für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert (Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454). Der Überstand wurde dann zu gleichen Teilen auf 2 Nickel-Säulen (2.2.4.E) mit je 1,5 ml Säulenbett verteilt, um das His-Epitop abzutrennen. Die Nickel-Säulen wurden vor ihrer Beladung wie unter 2.2.4.E beschrieben äquilibriert und dann mit 10 Säulenvolumina Spaltpuffer ohne CaCl₂ behandelt. Der Durchfluss wurde gesammelt und enthielt nur etwa 10% des gesamten Proteins, da dieses mit Nickel-Ionen in Wechselwirkung trat. Das restliche Protein wurde daher in 6 Fraktionen (à 750 µl) mit 100 mM Imidazol-haltigem Spaltpuffer (ohne CaCl₂) von der Säule eluiert. Danach wurden der Durchfluss und die Protein-haltigen Fraktionen miteinander vereinigt. Auf diese Weise blieben von den ursprünglich eingesetzten 30 mg noch ca. 18 mg His-freies Protein übrig. Danach wurden die Proteine, abhängig von den geplanten Versuchen, in einen Tris- oder K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer umdialysiert (3.4.1 und 2.2.4.G) und eventuell ankonzentriert (2.2.4.H).
- ❖ *pET47b/PKD2(797-980)*: Nach der Dialyse in Spaltpuffer wurde das Fusionsprotein nach folgendem Schema verdaut: 100 µg Protein in 50 µl Spaltpuffer mit 4 U (= 2 µl) Protease. Am Beispiel einer präparativen Aufreinigung soll weiterverfahren werden. Nach einem ü.N.-Verdau von 20 mg Protein in 12 ml Volumen mit 400 µl Enzym wurde die Reaktion auf 2 Nickel-Säulen mit jeweils 1,5 ml Säulenbett gegeben, um das His-Epitop und die His-fusionierte Protease zu entfernen. Der Durchfluss wurde verworfen, da das Protein zu 100% mit Nickel-Ionen in Wechselwirkung trat. Dieses wurde in 5 Fraktionen (à 2 ml) mit 100 mM Imidazol-haltigem Spaltpuffer von der Säule eluiert, wobei 1,5 ml Spaltpuffer in die Sammelröhrchen vorgelegt wurde. Die Protein-haltigen Imidazol-Fraktionen waren frei von Verunreinigungen durch die His-fusionierte Protease. Letztere war im Western-Blot (2.2.4.C) nur in den Fraktionen mit 1 M Imidazol zu detektieren, die im Anschluss an den 100 mM Imidazol-Schritt durchgeführt wurden. Anschließend wurden die Fraktionen mit 100 mM Imidazol vereinigt, gegen 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6,8/500 mM NaCl dialysiert (2.2.4.G) und

weiter ankonzentriert (2.2.4.H und 3.4.1). Auf diese Weise blieben von den ursprünglich eingesetzten 20 mg noch ca. 12 mg His-freies Protein übrig.

J. K_d -Wertbestimmung über Fluoreszenzspektrophotometer

Messungen zur K_d -Wertbestimmung über Fluoreszenzspektrophotometrie wurden mit dem Fluorescence Spektrophotometer CARY ECLIPSE (Varian) am Lehrstuhl Biochemie II, Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (Prof. Dr. R. Sterner, Universität Regensburg) durchgeführt. Das „His-freie Proteinprodukt“ von pET41a Δ GST/His-Thrombin/PKD2(680-796) wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt (Tyrosin-Reste). Die Emissionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 290 bis 310 nm aufgezeichnet, wobei die sog. Schlitzbreiten für die Exzitation und Emission auf 5 nm eingestellt wurden. Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 22°C in 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl, wobei mit Chelex (100 Sodium form)-Säulen (von Sigma) aufgereinigtes A. bid. (2.2) zur Herstellung des Puffers verwendet wurde. Für die Titrationsmessungen wurde 1 ml einer 50 μ M konzentrierten Protein-Lösung (gemessen über Absorptionsspektrum; siehe auch 2.2.4.A) in eine transparente Quarz-Küvette (QS 1.000 von Hellma) vorgelegt und als sog. „Null-Wert“ vermessen. Danach wurde in 1- bzw. 2 μ l Pipettierschritten eine 10 mM CaCl₂-Ligandlösung dazugegeben, wobei nach jeder Zugabe für 10 Sekunden mittels eines in der Küvette befindlichen Magnetstabes gemischt wurde und nach einer weiteren 1-minütigen Pause (zur Entfernung der Luftblasen nach dem Mischen) die Messung gestartet wurde. Insgesamt wurden 60 μ l Ligandlösung dazugegeben.

Die bei Zugabe der CaCl₂-Lösung zu beobachtende Fluoreszenz-Emissionsabnahme im Wellenlängenbereich von 290-310 nm wurde unter Verwendung der Emissionswerte bei 300 und 305 nm zur Berechnung des K_d -Wertes für die Interaktion des „His-freien Proteinproduktes“ von pET41a Δ GST/His-Thrombin/PKD2(680-796) mit Calcium herangezogen. Um die durch Verdünnungseffekte hervorgerufene Fluoreszenzänderung zu dokumentieren, wurde im Anschluss eine im Bezug auf die Durchführung der vorhergehenden Messung identische Messung mit Ligand-freiem Puffer durchgeführt. Aufgrund der zeitlich versetzten Durchführung der Calciumtitration und der Kontrollmessung mussten die Emissionswerte der Pufferkontrolle auf diejenigen der Calciumtitration korrigiert werden. Hierzu wurde für den genannten Wellenlängenbereich ein sog. Korrekturfaktor ermittelt, der sich aus dem Quotienten des „Emissions-Null-Wertes“ der Pufferkontrolle und des „Emissions-Null-Wertes“ der Calcium-

Lösung errechnet. Danach wurden alle Emissionswerte der Pufferkontrolle durch den jeweils ermittelten Korrekturfaktor dividiert.

Um nun die spezifisch durch die Calciumbindung hervorgerufene Fluoreszenzänderung zu erhalten, wurden anschließend die Emissionswerte der Calciumtitration von den korrigierten Emissionswerten der Pufferkontrolle subtrahiert. Die so für die Wellenlängenbereich von 300 bzw. 305 nm erhaltenen Werte wurden dann gegen die Gesamtkonzentration des Liganden (Calcium) aufgetragen. Die Calcium-Kontamination der Proteinlösung (2.2.4.M), sowie die im Verlauf der Titration auftretende Verdünnung der Ligandlösung wurden für die Ermittlung der Gesamt-Ligandkonzentration pro Titrationsschritt berücksichtigt. Die Datenpunkte wurden mit einer quadratischen Funktion gefittet (in SigmaPlot 9.0), die die Ligandbindung beschreibt, wobei die freie Ligandkonzentration berücksichtigt wird (Reinstein et al., 1990):

$$F = F_0 + (F_{\max} - F_0) * 0,5 * ((1 + (L_0 + K_d) / E_0) - ((1 + (L_0 + K_d) / E_0)^2 - 4 * L_0 / E_0)^{0,5})$$

L_0 : Gesamt-Ligandkonzentration

E_0 : Gesamt-Proteinkonzentration

F_0 : Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt 0

F_{\max} : maximale Fluoreszenzemissionsänderung

F : Fluoreszenzemission, die gemessen wird

K_d : Dissoziationskonstante

K. K_d -Wertbestimmung über Quarzmikrowaage-technik

Die Messungen wurden von Sabine Bosk am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (Prof. Dr. C. Steinem; Georg-August-Universität Göttingen) im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Bosk, 2007). Für die im Rahmen des Kooperationsprojektes durchgeführten Messungen wurden festkörperunterstützte Modellmembranen aus DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1) auf Goldelektroden von Schwingquarzen aufgebracht, deren Qualität mittels Impedanzspektroskopie kontrolliert wurde (Bosk, 2007). Auf diese Weise können His-fusionierte Proteine an der Waage irreversibel immobilisiert werden. Nach einem Spülvorgang zur Entfernung von unspezifisch gebundenem bzw. ungebundenem Protein kann der Interaktionspartner zugegeben werden, wobei die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen zeitaufgelöst detektiert werden kann. Die Adsorption von Proteinen an die Membran oder an Proteine, die an der Membran immobilisiert wurden, kann in der Regel mit der sog. Langmuir-Isotherme beschrieben werden, wobei folgende Bedingungen gelten müssen (Bosk, 2007):

- ❖ Die Adsorption führt höchstens zu einer Monolage adsorbierter Moleküle.
- ❖ Die Oberfläche ist einheitlich und alle Bindestellen sind gleichwertig.
- ❖ Die Fähigkeit eines Moleküls an eine bestimmte Bindestelle zu binden hängt nicht von der Besetzung benachbarter Bindestellen ab.

Nach Sauerbrey et al. (1959) verhält sich die Änderung der Resonanzfrequenz (Δf) direkt proportional zu der abgeschiedenen Masse, so dass der nachfolgend gezeigte Term, der die Abhängigkeit der Frequenzänderung (Δf_e) von der Ligandkonzentration ($c_{L,0}$) beschreibt, zur Errechnung des K_d -Wertes (Dissoziationskonstante) herangezogen werden kann.

$$\Delta f_e = \Delta f_{\max} \frac{c_{L,0}}{K_d + c_{L,0}}$$

Δf_e = maximale Frequenzänderung nach Zugabe einer definierten Ligandkonzentration ($c_{L,0}$)
 K_d = Dissoziationskonstante
 Δf_{\max} = maximale Frequenzänderung nach Absättigung aller zur Verfügung stehender Bindungsstellen durch den Liganden

Über eine Auftragung der sog. konzentrationsabhängigen Ratenkonstante (k_s) als Funktion der zugegebenen Ligandkonzentration kann dann der k_{off} -Wert (Dissoziationsratenkonstante) aus dem y-Achsenabschnitt und der k_{on} -Wert (Assoziationsratenkonstante) aus der Steigung abgelesen werden. Die konzentrationsabhängige Ratenkonstante (k_s) beschreibt die Krümmung der exponentiellen Abnahme der Resonanzfrequenz während der Ligandbindung.

$$k_s = k_{\text{on}} c_{L,0} + k_{\text{off}}$$

k_s = konzentrationsabhängige Ratenkonstante: beschreibt die Krümmung der exponentiellen Abnahme der Resonanzfrequenz während der Ligandbindung
 k_{on} = Assoziationsratenkonstante k_{off} = Dissoziationsratenkonstante
 $c_{L,0}$ = zugeführte Ligandkonzentration

Die k_s -Werte wiederum können aus der Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die zeitliche Änderung der Frequenz (bei Zugabe des Interaktionspartners) erhalten werden.

$$\Delta f(t) = \Delta f_e (1 - \exp(-k_s t))$$

$\Delta f(t)$ = Frequenzänderung zum Zeitpunkt t
 Δf_e = maximale Frequenzänderung nach Zugabe einer definierten Ligandkonzentration
 k_s = konzentrationsabhängige Ratenkonstante: beschreibt die Krümmung der exponentiellen Abnahme der Resonanzfrequenz während der Ligandbindung
 t = Zeit in Sekunden

L. NMR-Messungen

Die Messungen wurden von Dr. Frank Schumann am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer; Universität Regensburg) durchgeführt.

M. ICP-OES (Atomemissionsspektralanalyse mit induktiv gekoppeltem Plasma)

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die ICP-OES-Messung durchgeführt, um den Calcium-Gehalt der für die Fluoreszenz-Spektroskopie-Messung (2.2.4.J) eingesetzten 50 µM konzentrierten Proteinlösung („His-freies Proteinprodukt“ von pET41aΔGST/His-Thrombin/PKD2(680-796) in 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl) sowie der entsprechenden Protein-freien Lösung (5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl) zu bestimmen. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Huber am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. Dr. M. Thomm; Universität Regensburg) an einem JOBIN YVON JY70 Plus durchgeführt. Bei der ICP-OES wird durch einen 1000 V-Generator ein Magnetfeld erzeugt, durch das die Zündung eines Argon-Plasmas (10000-12000 K) hervorgerufen wird. Wird nun 1 ml einer flüssigen Probe über ein Zerstäubersystem in das Plasma gesprüht, so wird die Probe vollständig ionisiert, also die Elektronen vollständig vom Atomkern getrennt. Wenn die Elektronen in ihren Grundzustand zurückfallen, dann geben sie eine charakteristische Strahlung (= Hauptlinien) ab. Dieses emittierte Spektrum wird in ein Spektrometer geleitet, wo es in die einzelnen Wellenlängen zerlegt wird, deren Intensität bestimmt wird. Die quantitative Bestimmung erfolgt dabei auf der Grundlage der Proportionalität von Strahlungsintensität und Elementkonzentration in Eich- und Analyseproben (http://www.fz-juelich.de/zch/icp_oes). Die Nachweisgrenze erreicht dabei je nach Element und Messverfahren den ppb-, oft sogar den ppt-Bereich. Als Eichlösungen wurden folgende CaCl₂-Lösungen mit Chelex-Beads behandeltem A. bid. (2.2) hergestellt:

0 mg/l 50 µg/l 300 µg/l 1 mg/l 5 mg/l 15 mg/l

Alle Messungen wurden bei 8 bar Gasdruck durchgeführt. Um ein Verstopfen der Sprühanlage während der Messungen infolge des hohen Salzgehaltes zu vermeiden, wurde die Anlage in regelmäßigen Abständen mit Salpetersäure (2%) gespült.

3. Ergebnisse

3.1 Topologie-Studien für humanes Polycystin-2

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) wird durch Mutationen im Polycystin-1-Gen (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994) und Polycystin-2-Gen (Mochizuki et al., 1996) verursacht. Im Fall von PC1 konnten bereits durch Nims et al. (2003) die Topologie-Verhältnisse aufgeklärt werden. Für PC2 hingegen wurde bisher lediglich die auf Hydrophobizitäts-Plots basierende Theorie von Mochizuki et al. (1996) veröffentlicht, nach der das Protein sechs Transmembrandomänen besitzt, wobei der N- und C-Terminus ins Zytoplasma ragen. Während die Schleifenregionen 1, 3 und 5 im ER-Lumen bzw. extrazellulär liegen, sollen die Schleifenregionen 2 und 4 zytoplasmatisch liegen (vgl. auch 1.3). Dieses Modell wurde von der Swissprot-Datenbank mit mehr oder wenigen kleinen Abweichungen bezüglich der Start- und Endpunkte der einzelnen Transmembransegmente bestätigt (vgl. auch Abb. 4). Da Topologie-Daten nicht nur zur strukturellen, sondern auch zur funktionellen Charakterisierung von Proteinen - zum Beispiel hinsichtlich fehlgefalteter oder verkürzter Mutationsformen - beitragen können, sollten im Rahmen dieser Arbeit Topologie-Studien für humanes Polycystin-2 durchgeführt werden.

In einer Zelle stellt die Lipiddoppelmembran eine Grenzschicht dar, die verschiedene intrazelluläre Kompartimente voneinander und das Zellinnere von der extrazellulären Umgebung abtrennt. Basierend auf der Undurchlässigkeit einer Lipiddoppelschicht für hydrophile Moleküle sind bestimmte Membranproteindomänen, je nach ihrer Lage im Bezug auf die Grenzschicht, unterschiedlich gut zugänglich für verschiedene Agenzien bzw. enzymatische Modifikationen. Indem man einfach zu detektierende Zielsequenzen wie zum Beispiel *N*-Glykosylierungsstellen, Cystein-Reste, iodierbare Stellen, Antikörperpitope oder Protease-Spaltstellen über Mutagenese-PCR in die Schleifenbereiche der Polypeptid-Sequenz einführt, kann man durch Verwendung von membranimpermeablen Reagenzien, Protein-modifizierenden Enzymen oder Proteasen die Topologie eines Membranproteins charakterisieren (van Geest und Lolkema, 2000). Der Vorteil der genannten Assays ist, dass hier mit dem vollständig translatierten Proteinprodukt gearbeitet werden kann. Im Rahmen von Vorexperimenten zu diesem Projekt wurde daher die Strategie verfolgt, die Topologie von Polycystin-2 aufzuklären, indem künstliche *N*-Glykosylierungsstellen in die postulierten Schleifenbereiche eingeführt werden, wobei zunächst sämtliche nativen *N*-








Glykosylierungsstellen entfernt werden mussten. Die Lage des modifizierten Schleifenbereiches sollte dabei durch Verwendung von deglykosylierenden Enzymen wie Endo H oder PNGase F geklärt werden, da diese nur bei ER-lumenwärts orientierten Schleifenbereichen eine Veränderung des Laufverhaltens von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel anzeigen. Es stellte sich allerdings heraus, dass Polycystin-2 nach Entfernen sämtlicher nativen *N*-Glykosylierungsstellen degradiert wurde (pers. Mitteilung Prof. Dr. R. Witzgall). Alle weiteren genannten chemischen bzw. enzymatischen Modifikations-Assays sind mit einem nicht minder großen Risiko der Proteininstabilität und damit der Proteindegradierung behaftet und stellen auch einen hohen Zeitaufwand hinsichtlich der Generierung der Expressionskonstrukte dar (im Falle der Cysteine müssten 13 native Stellen entfernt werden). Das Einbringen von Antikörper-Epitopen oder Spaltsequenzen führt ebenfalls recht häufig zu instabilen Proteinen bzw. funktionell inaktiven Proteinen, da vermutlich die native Proteinstruktur zu sehr verändert wird (Lin et al., 1999, Lewis et al., 2001; Hong et al., 2007). Daher wurde entschieden, eine ebenfalls recht häufig verwendete, auf Genfusion beruhende Methode zur Aufklärung der Topologie von Polycystin-2 zu verwenden. Bei dieser Vorgehensweise stellt man sog. C-terminale Deletions-Fusionskonstrukte von Polycystin-2 her, die auf der C-terminalen Verknüpfung der Aminosäuresequenz des in einem der jeweiligen Schleifenregionen abgeschnittenen Proteins mit einem Reportermolekül bestehen. Als Reporter kommen dabei Antikörper-Epitope (z.B. HA-Epitop), Enzyme (z.B. alkalische Phosphatase) oder modifizierbare Aminosäuresequenzen (z.B. Glykosylierungsstellen) in Frage (van Geest und Lolkema, 2000), wobei auf letzteres aufgrund der oben erwähnten Problematik verzichtet wurde. Bei der Wahl eines Antikörper-Epitops bieten sich für die Lokalisierung der Schleifenregionen neben immunzytochemischen Methoden auch sogenannte Protease-protection-Assays mit Mikrosomen an. Beide Assays beruhen dabei auf der durch die Protein-Topologie bedingten Zugänglichkeit bzw. Unzugänglichkeit des Epitops für einen Antikörper bzw. eine Protease. Im Fall eines Enzyms wie der alkalischen Phosphatase gibt es die Möglichkeit eines funktionellen Nachweises in Form einer Farbreaktion zur Lokalisierung der Schleifenregion, da die Enzymaktivität von der subzellulären Lokalisation abhängig ist. Im Folgenden soll auf diese Methoden näher eingegangen werden (vgl. auch 3.1.1).

3.1.1 Topologische Charakterisierung von Polycystin-2 mittels Immunzytochemie und Protease-protection-Assays

Im Bezug auf strukturelle und funktionelle Informationen über die einzelnen Domänen von Polycystin-2 liegen für den N- und C-Terminus bereits einige Daten in Form von Signalsequenzen, Phosphorylierungsstellen und Protein-Interaktionsstellen vor (siehe auch 1.3 und Abb. 4).

10	20	30	40	50	60
MVNSSRVQPQ	QPGDAKRPPA	PRAPDPGRML	AGCAAVGASL	AAPGGLCEQR	GLEIEMQRIR
70	80	90	100	110	120
QAAARDPPAG	AAASPSPPLS	SCSRQAWSRD	NPGFEAEESL	EEVEGEEGGM	VVEMDVEWRP
130	140	150	160	170	180
GSRRSAASSA	VSSVGARSRG	LGGYHGAGHP	SGRRRRREDQ	GPPCPSPVGG	GDPLHRHLPL
190	200	210	220	230	240
EGQPPRVAWA	ERLVRGLRGL	WGTRLMEESS	TNREKYLKSV	LRELVTYLLF	LIVLCILTYG
250	260	270	280	290	300
MMSSNVYYIT	RMMSQLFLDT	PVSKTEKTNF	KTLSMEDFW	KFTEGSLLDG	LYWKMQPSNQ
310	320	330	340	350	360
TEADNRSFIF	YENLLLVPR	IRQLRVRNGS	CSIPQDLRDE	IKECYDVYSV	SSEDRAFFGP
370	380	390	400	410	420
RNGTAWIYTS	EKDLNGSSHW	GIIATYSGAG	YYDLRSRTRE	ETAAQVASLK	KNVWLDGRTR
430	440	450	460	470	480
ATFIDFSVYN	ANINLFCVVR	LLVEFPATGG	VIPSWQFQP	KLIRYVTTFD	FFLAACETIF
490	500	510	520	530	540
CFIFIFYVVE	EIEIRIHKL	HYFRSEFNCL	DVIVVLSVV	AIGINIYRTS	NVEVLLQFLE
550	560	570	580	590	600
DQNTFPNFEH	LAYWQIQFNN	IAAVTVFFVW	IKLFRFINFN	RMSQLSTTM	SRCAKDLFGF
610	620	630	640	650	660
AIMFFIIFLA	YAQLAYLVFG	TQVDVDFSTFQ	ECIFTQFRII	LGDINFAEIE	EANRVLGPITV
670	680	690	700	710	720
FTTEVFFMFF	ILLNMFLATI	NDTYSEVKSD	LAQQKAEMEL	SDLIRKGYHK	ALVKLKLKKN
730	740	750	760	770	780
TVDDISESLR	QGGGKLNDFE	LRQDLKKGKH	TDAEIEAIFT	KYDQDGDQEL	TEHEHQQMRD
790	800	810	820	830	840
DLEKEREDLD	LDHSSLPRPM	SSRSFPRSLD	DSEEDDEDS	GHSSRRRSGI	SSGVSYEETFQ
850	860	870	880	890	900
VLVRRVDRME	HSIGSIVSKI	DAVIVKLEIM	ERAKLKRREV	LGRLLDGVAE	DERLGRDSEI
910	920	930	940	950	960
HREQMERLVR	EELERWESDD	AASQISHGLG	TPVGLNGQPR	PRSSRPSSSQ	STEGMEGAGG
NGSSNVHV					

Abb. 4: Aminosäuresequenz von humanem Polycystin-2.

	Transmembrandomäne nach Mochizuki et al. (1996)		RVxP-Exportsignal für die Zilienmembran in den ersten 15 AS nach Geng et al. (2006)
	Transmembrandomäne nach UniProtKB/Swiss-Prot entry Q13563		Phosphorylierungsstellen nach Streets et al. (2006)
	Letzte AS des jeweiligen Schleifen-Konstruktes		Phosphorylierungsstelle nach Cai et al. (2004) und Köttgen et al. (2005)
	34 AS ER-Retentionssignal nach Cai et al. (1999)		

So konnten für den C-Terminus 15 Bindungspartner detektiert werden (siehe auch 1.6), die einen für die diversen Interaktionen erforderlichen Aminosäurebereich von AS 687 bis 968 abdecken (siehe auch 1.6). Da bis auf TRPC1 und den IP₃-Rezeptor alle Bindungspartner als lösliche, zytoplasmatische Proteine bezeichnet werden können und zusätzlich eine Phosphorylierungsstelle am Serinrest 812 (Cai et al., 2004; Köttgen et al., 2005) publiziert werden konnte, wird deutlich, dass für den C-Terminus eine zytoplasmatische Lokalisation anzunehmen sein muss. Was den N-terminalen Bereich des Proteins betrifft, so konnte innerhalb der Aminosäuren 1 bis 15 ein Zilien-Lokalisationsmotiv (RVxP) lokalisiert (Geng et al., 2006) und die Serin-Reste 76 und 80 als Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Streets et al., 2006). Außerdem fanden Streets et al. (2006) heraus, dass eine Mutation der zur Zeit als Hauptphosphorylierungsstellen bezeichneten Serine an Position 76, 80 und 812 keinesfalls ausreichte, die „³²P-Markierung“ von Polycystin-2 zu verhindern. Dies impliziert, dass noch weitere Aminosäuren im N- bzw. C-Terminus wie z.B. AS 74, 122 und 125 bzw. 721, 801, 831 und 943 potentielle Phosphorylierungskandidaten darstellen (Mochizuki et al., 1996; Streets et al., 2006), was ebenfalls eine zytoplasmatische Ausrichtung dieser beiden Domänen erforderlich macht. In einer weiteren Publikation wird neben den Aminosäuren 821-878 (C-Terminus) die N-terminale Aminosäureregion 1-215 als Interaktionsbereich von Polycystin-2 mit α -Actinin, einem Aktin-bindenden Protein, beschrieben (Li et al., 2005b). Ähnlich wie bei α -Actinin wurden auch für KIF3B, einer Untereinheit des Mikrotubuli-assoziierten Motorproteins Kinesin-2, mit den Aminosäureabschnitten 682-968 und 1-215 wieder N- und C-terminale Bereiche als Interaktionsdomänen definiert (Wu et al., 2006). Daher stellen auch diese Befunde deutliche Indizien für die zytoplasmatische Ausrichtung des N- und C-Terminus von Polycystin-2 dar. So konnte mit einem gegen die Aminosäuren 103 bis 203 (N-Terminus) von Polycystin-2 gerichteten Antikörper bereits ein erster Hinweis für die zytoplasmatische Ausrichtung des N-Terminus erhalten werden (Cai et al., 1999). In dieser Publikation wird gezeigt, dass der N-Terminus einer plasmamembranständigen, nach Aminosäure 741 (C-Terminus) deletierten Mutante von PC2 (dieser Mutante fehlt ein ER-

Retentionssignal: AS 787-820; vgl. auch Abb. 5) erst nach Permeabilisierung der Zellen detektierbar war. Aus diesem Grund wurde für die topologische Charakterisierung von Polycystin-2 mittels Immunzytochemie und Protease-protection-Assays ein besonderes Augenmerk auf die Zuordnung der Schleifendomänen gerichtet. Die hierfür erstellten Expressionskonstrukte sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

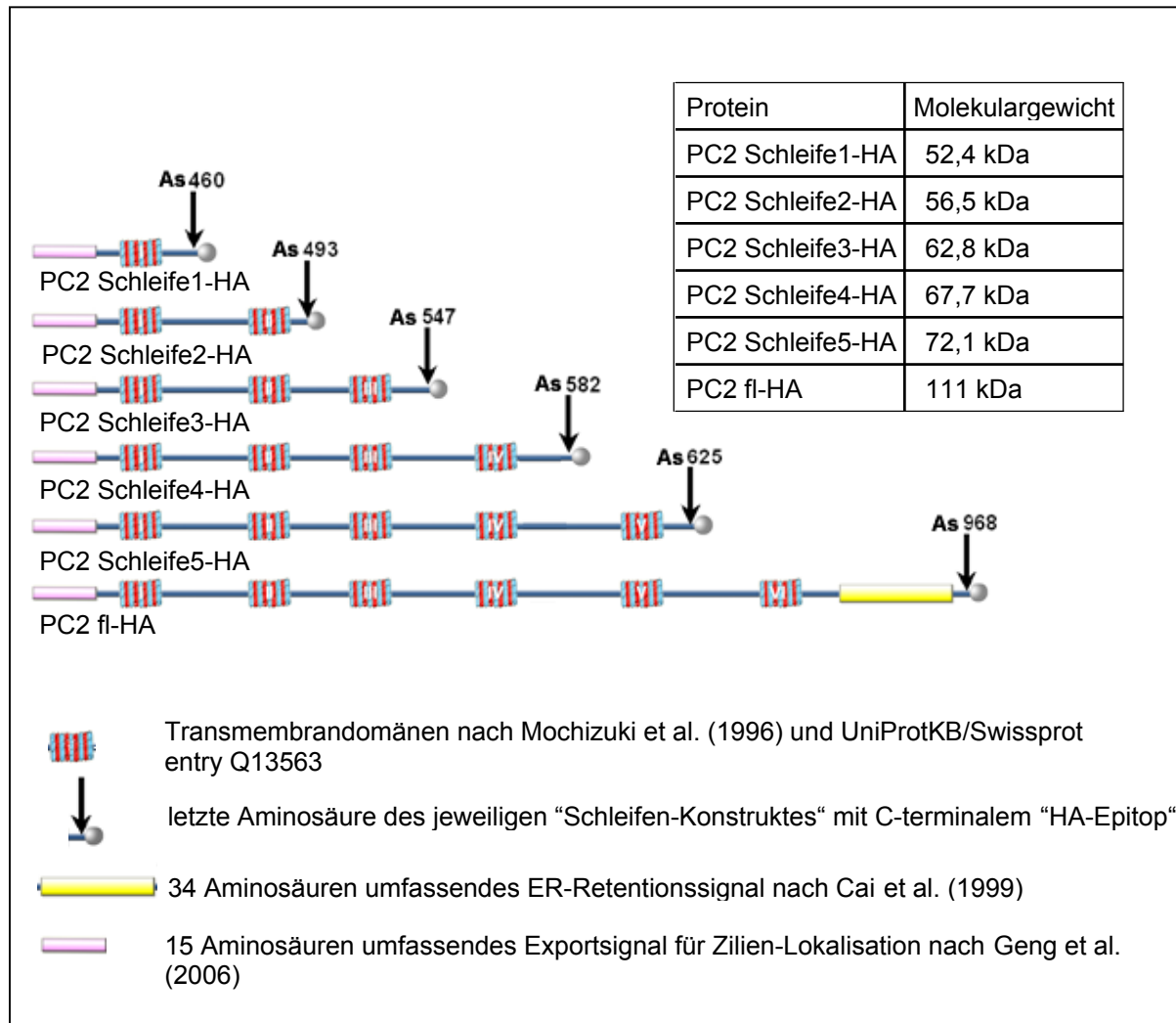


Abb. 5: Schematische Darstellung der für die topologische Charakterisierung von PC2 generierten Expressionskonstrukte.

Die in Abbildung 5 dargestellten Konstrukte kodieren für Polycystin-2 Varianten, welche die Aminosäuresequenz von humanem PC2 bis Aminosäure 460 (PC2 Schleife 1-HA), 492 (PC2 Schleife 2-HA), 547 (PC2 Schleife 3-HA), 582 (PC2 Schleife 4-HA) und 625 (PC2 Schleife 5-HA). Alle Schleifen-Konstrukte sowie das Volllängenprotein wurden C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert (AS 98-106 aus dem HA₁-Anteil des Influenza-Virus-HA-Proteins; siehe auch 2.1.8.A; Modrow und Falke, 1998).

A. Immunzytochemische Verfahren zur Bestimmung der Topologie der Schleifendomänen von Polycystin-2

Um zu überprüfen, ob die unter Abbildung 5 vorgestellten Konstrukte vollständig translatiert werden, wurden COS-7-Zellen (Nieren-Zellen aus der grünen Meerkatze; vgl. auch 2.1.9.B) mit den für die Topologie-Studien vorgesehenen Schleifen-Konstrukten transient transfiziert (vgl. auch 2.2.2.E). Achtundvierzig Stunden später wurden die Zellen lysiert, wobei die Lysate einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen den N-Terminus von PC2 gerichteten Antikörper (YCB9) unterzogen wurden (Abb. 6).

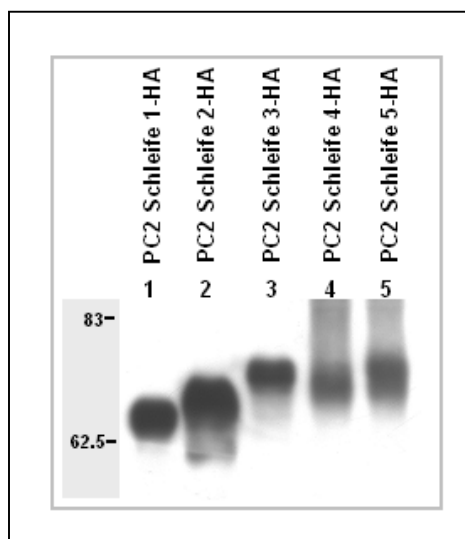
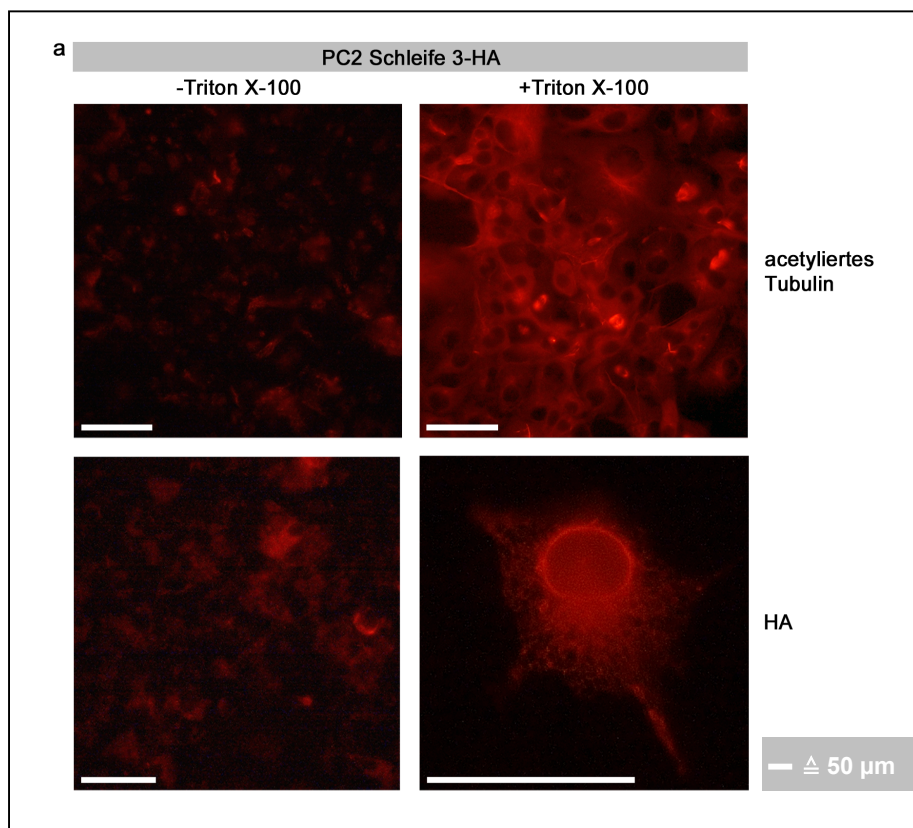


Abb. 6: Expressionstest von PC2 Schleife 1-5-HA in COS-7-Zellen. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und 30 µg Lysat auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.4.B) geladen, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde (2.2.4.D), die mit einem gegen den N-Terminus von Polycystin-2 gerichteten Antikörper (YCB9; siehe auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D). **Alle fünf Proteine werden vollständig translatiert und mit vergleichbarer Effizienz exprimiert.**

In Kombination mit den Abbildungen 7 bzw. 11-15 zeigt der in Abbildung 6 aufgeführte Blot, dass alle 5 Fusionsproteine vollständig translatiert werden, wobei die Proteine PC2 Schleife 1-, 2- und 3-HA (Spur 1-3) deutlich höher laufen als nach den Molekulargewichtsberechnungen (siehe auch Abb. 5) zu erwarten wäre. Eine Erklärung hierfür bieten die nach Mochizuki et al. (1996) postulierten 5 *N*-Glykosylierungsstellen in der ersten Schleifenregion von Polycystin-2 an Aminosäureposition 299, 305, 328, 362 und 375. Die Tatsache, dass PC2 Schleife 4- und 5-HA im Vergleich zu den drei anderen Schleifen-Mutanten ungefähr auf der berechneten Molekulargewichtshöhe laufen, ist auf die möglicherweise in Verbindung mit der Plasmamembrantranslokation der beiden Proteine (siehe auch weiter unten) auftretende Prozessierung der angehängten Zuckerreste (im Golgi-Apparat) zurückzuführen. Diese Prozessierung ist vermutlich der Grund für die verschmierten Banden, die oberhalb der jeweiligen in Spur 4 und 5 zu sehenden Hauptbande laufen (vgl. Abb. 6, Spur 4 und 5). So wurde im Verlauf der unter 3.2.3.A und 3.2.4.A aufgeführten Versuche festgestellt, dass ein 100°C-Denaturierungsschritt in SDS-Probenpuffer wohl für eine Aggregatbildung von

plasmamembranständigen Mutationsformen von Polycystin-2 verantwortlich ist, was zur Folge hat, dass diese in Form von Bandenleitern laufen, die zu höheren Molekulargewichtsgrößen hin verschoben sind (daher wurde bei den unter 3.2.3.A und 3.2.4.A gezeigten Blot-Versuchen auf den üblicherweise durchgeführten 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 100°C verzichtet).

Für die immunzytochemische Lokalisierung der Schleifendomänen von Polycystin-2 wurden COS-7-Zellen mit den in Abbildung 5 gezeigten Konstrukten (PC2 Schleife 1-5-HA) transient transfiziert. Da allen Mutanten das nach Cai et al. (1999) postulierte (C-terminale) ER-Retentionssignal fehlt (siehe auch 1.5 und Abb. 4 und Abb. 5), sollten alle Proteine zur Plasmamembran transportiert werden. Die immunzytologische Zuordnung der einzelnen Schleifenbereiche sollte daher über den Nachweis der Zugänglichkeit bzw. Unzugänglichkeit des HA-Epitops für einen Epitop-spezifischen Antikörper (12CA5) in unpermeabilisierten Zellen erfolgen, wobei mit Triton X-100 permeabilisierte Zellen desselben Transfektionsansatzes als Kontrollen für die erfolgreiche Expression fungierten (vgl. auch Abb. 7a-c). Eine gegen acetyliertes Tubulin (zytoplasmatisches Protein) gerichtete Antikörper-Färbung diente dabei der Überprüfung der Intaktheit der Zellen im unpermeabilisierten Zustand (vgl. auch Abb. 7a-c).



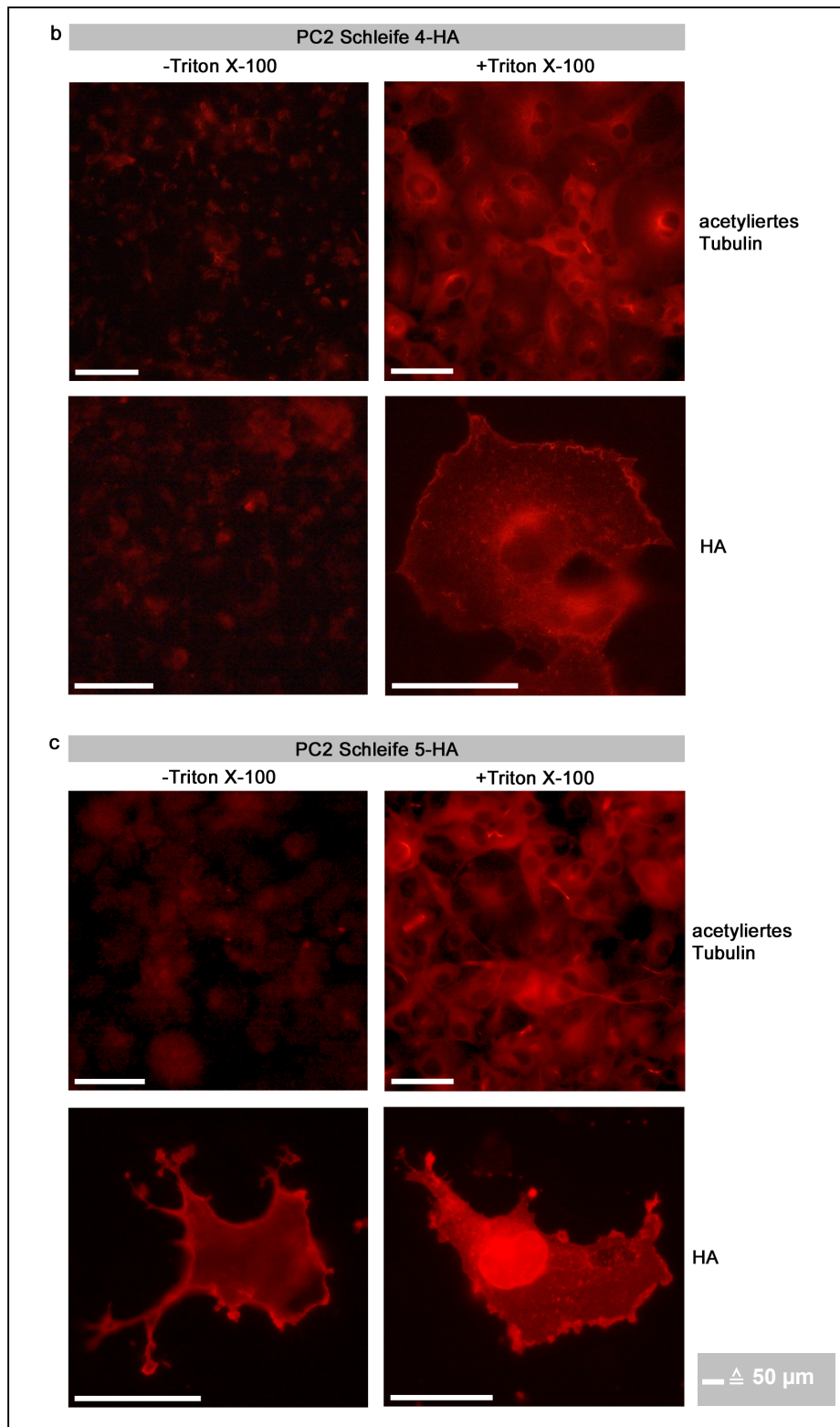


Abb. 7: Immunzytochemische Topologiebestimmung der Schleifendomänen 3, 4 und 5 in COS-7-Zellen. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in PFA fixiert. Ein Teil der Zellen wurde durch Behandlung mit 1x PBS im unpermeabilisierten Zustand (**-Triton X-100**) belassen, der andere Teil wurde mit 0,25% Triton X-100 permeabilisiert (**+Triton X-100**). Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (gilt für a, b und c). **Obere Reihe:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (s. auch 2.1.7.A). **Untere Reihe:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; s. auch 2.1.7.A). Die Detektion beider Primärantikörper erfolgte über Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B). Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit DMC 2-Kamera fotografiert (x40), wobei für die unpermeabilisierten bzw. permeabilisierten Zellen identische Belichtungszeiten und Belichtungsstärken verwendet wurden. Um die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Schleifenmutanten

besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **PC2 Schleife 3-HA wird im ER zurückgehalten, wohingegen PC2 Schleife 4-HA und PC2 Schleife 5-HA zur Plasmamembran transportiert werden. Schleifendomäne 5 ist nach extrazellulär, Schleifendomäne 4 zum Zytoplasma hin ausgerichtet.**

Es stellte sich allerdings heraus, dass die in Schleifendomäne 1, 2 und 3 abgeschnittenen PC2-Proteine intrazellulär zurückgehalten werden, was eine topologische Zuordnung der jeweiligen Schleifendomänen verhinderte. Daher sind die aus diesem Experiment erhaltenen Daten für die in den ersten drei Schleifendomänen abgeschnittenen Proteine exemplarisch an PC2 Schleife 3-HA dargestellt. So kann im Falle dieser 3 Proteine immer erst nach Triton X-100-Behandlung ein positives Antikörper-Signal detektiert werden (vgl. Abb. 7a, HA), wobei dann ein zytoplasmatisches, perinukleär verstärktes, netzwerkartiges Färbemuster zu erkennen ist, das zum Zellrand hin an Intensität verliert. Zellgrenzen sind hier nicht zu erkennen (vgl. Abb. 7a, HA). Dieses Färbemuster entspricht demjenigen, das bei der Synthese von C-terminal HA-markiertem Wildtyp PC2 in COS-7- oder anderen Nierenepithel-Zellen wie HEK 293 (Mensch) oder LLC-PK₁ (Schwein) zu sehen ist (Cai et al., 1999; Cedzich, 2000; vgl. auch Abb. 9 und 10). Nach Kolokalisationsstudien mit PDI, einem luminalen ER-Protein, wurde daher eine vornehmliche ER-Lokalisation für Polycystin-2 abgeleitet (Cai et al., 1999; Cedzich, 2000). Die in Abbildung 7a gezeigten Befunde sprechen demnach ebenfalls für eine Retention der in den drei ersten Schleifendomänen abgeschnittenen Proteine im ER.

Ganz im Gegensatz dazu erkennt man im Fall der Fusionsproteine PC2 Schleife 4-HA und PC2 Schleife 5-HA zusätzlich zu einer zytoplasmatischen Färbung deutlich Zellgrenzen bei den permeabilisierten bzw. unpermeabilisierten Zellen (vgl. auch Abb. 7b und c, HA). Da eine solche Färbung auch bei plasmamembranständigen, nach Aminosäure 741 oder 703 deletierten PC2-Mutanten (diesen Mutanten fehlt ein ER-Retentionssignal: AS 787-820; vgl. auch Abb. 5) in COS-7- oder anderen Nierenepithel-Zellen zu beobachten ist (Cai et al., 1999; Cedzich, 2000), kann davon ausgegangen werden, dass PC2 Schleife 4- und 5-HA wie erwartet in die Plasmamembran integriert werden. Die perinukleär verstärkten Färbungen bei PC2 Schleife 4- und 5-HA deuten an, dass ein gewisser Teil des Protein-Pools intrazellulär verbleibt. Nichtsdestotrotz konnte für diese beiden Proteine aufgrund ihrer Plasmamembrantranslokation eine topologische Charakterisierung nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt werden (vgl. auch Abb. 7b und c). So zeigten nur diejenigen Zellen im unpermeabilisierten Zustand ein positives Antikörper-Signal, die PC2 Schleife 5-HA produzierten (vgl. auch Abb. 7c, HA). Damit ergibt sich für die fünfte Schleifendomäne eine extrazelluläre und für die vierte Schleifendomäne eine

zytoplasmatische Ausrichtung, was die Vorhersagen von Mochizuki et al. (1996) bestätigt. Da aufgrund der in Abbildung 6 gezeigten Bandenintensitäten davon ausgegangen werden kann, dass die ER-Retention von PC2 Schleife 1-, 2- und 3-HA bzw. die Plasmamembrantranslokation von PC2 Schleife 4- und 5-HA nicht durch deutlich unterschiedliche Expressionseffizienzen bedingt war, muss es einen anderen Grund für die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der 5 Proteine geben. Als Ursache wird daher ein zwischen Aminosäure 547 (letzte AS von PC2 Schleife 3-HA) und 582 (letzte AS von PC2 Schleife 4-HA) befindliches Exportsignal vermutet (dieser Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterbearbeitet und wird unter 3.2 näher beleuchtet). Da also die ER-Retention durch Veränderungen im Transfektionsprotokoll etc. nicht behoben werden konnte, war der immunzytologische Ansatz in der geplanten Form nicht durchführbar.

Um trotz alledem bei den immunzytochemischen Topologie-Studien auch die im ER verbleibenden Proteine mit einbeziehen zu können, wurde daher entschieden, neben unpermeabilisierten und Triton X-100 permeabilisierten Zellen auch Zellen heranzuziehen, die mit einem membranselektiven Detergens wie Digitonin, einem sog. nichtionischen Tensid, behandelt wurden. Digitonin ($C_{56}H_{92}O_{29}$) ist ein Glykosid aus der Gruppe der Saponine (Steroidsaponine), das ausschließlich die Plasmamembran von Zellen durchlässig macht (Sigma-Aldrich Co., 2006). Somit kann ungeachtet der subzellulären Lokalisation eines Membranproteins selektiv zwischen den nach extrazellulär, zytoplasmatisch und ins ER-Lumen ausgerichteten Schleifenregionen differenziert werden (s. auch Abb. 8).

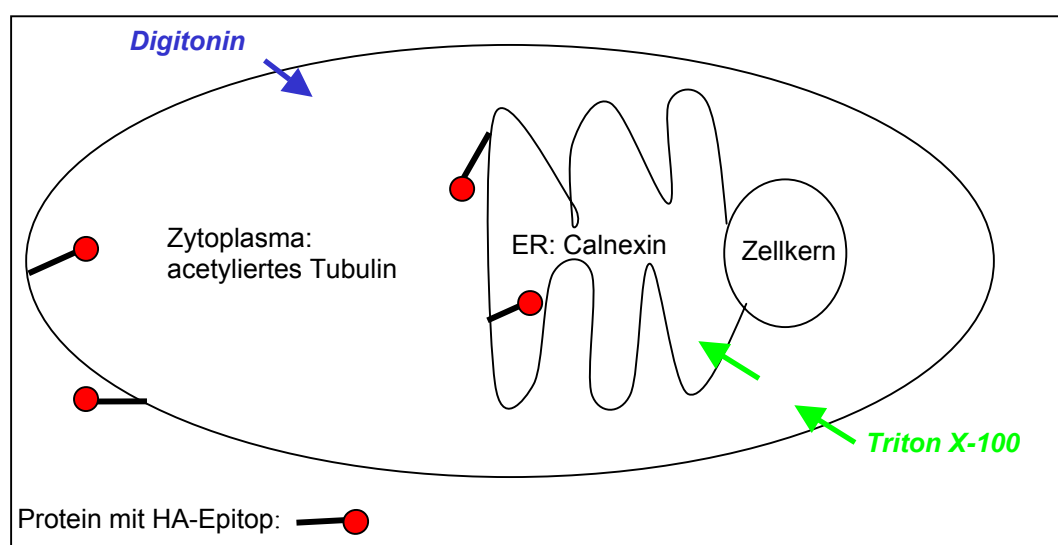


Abb. 8: Modell für Immunzytochemie mit 3 Permeabilisierungsstufen.

Um überprüfen zu können, ob nach einer Digitonin-Behandlung von Zellen eine spezifische Detektion von zytoplasmatisch ausgerichteten Proteindomänen möglich ist, wurde beschlossen, COS-7-Zellen mit dem unter Abbildung 5 gezeigten Konstrukt für ein C-terminal HA-markiertes Volllängen-PC2-Protein transient zu transfizieren. Nach den unter 3.1.1 erläuterten Gründen müssten die N- und C-terminalen Enden des ER-ständigen Wildtyp-PC2 bereits nach der Digitonin-Permeabilisierung der genannten Zellen immunologisch zu detektieren sein, ohne dass die ER-luminale, N-terminale Domäne (Ca^{2+} -bindend) des ER-Membranproteins Calnexin (immunologisch) nachzuweisen ist. Für dieses Experiment wurden die transfizierten Zellen achtundvierzig Stunden nach der Transfektion entweder mit Triton X-100, Digitonin oder 1x PBS behandelt, um die unter Abbildung 8 aufgezeigten selektiven Permeabilisierungsstufen zu erhalten. Für die Lokalisierung des C-Terminus wurde ein anti-HA-Antikörper (12CA5) benutzt (Abb. 9b, e und h), für die Lokalisierung des N-Terminus hingegen wurde ein Antikörper (YCB9) herangezogen (Abb. 10b, e und h), der durch Verwendung des Aminosäurebereiches 103-203 (N-Terminus) von humanem PC2 als Immunogen entstanden ist. Als Permeabilisierungs-Kontrollen dienten wiederum Antikörper-Färbungen gegen acetyliertes Tubulin und Calnexin (vgl. Abb. 9-10a, c, d, f und g). Die Expressionskontrolle für das HA-markierte Volllängenprotein zur Dokumentation der vollständigen Translation ist unter anderem in Abbildung 22 zu sehen.

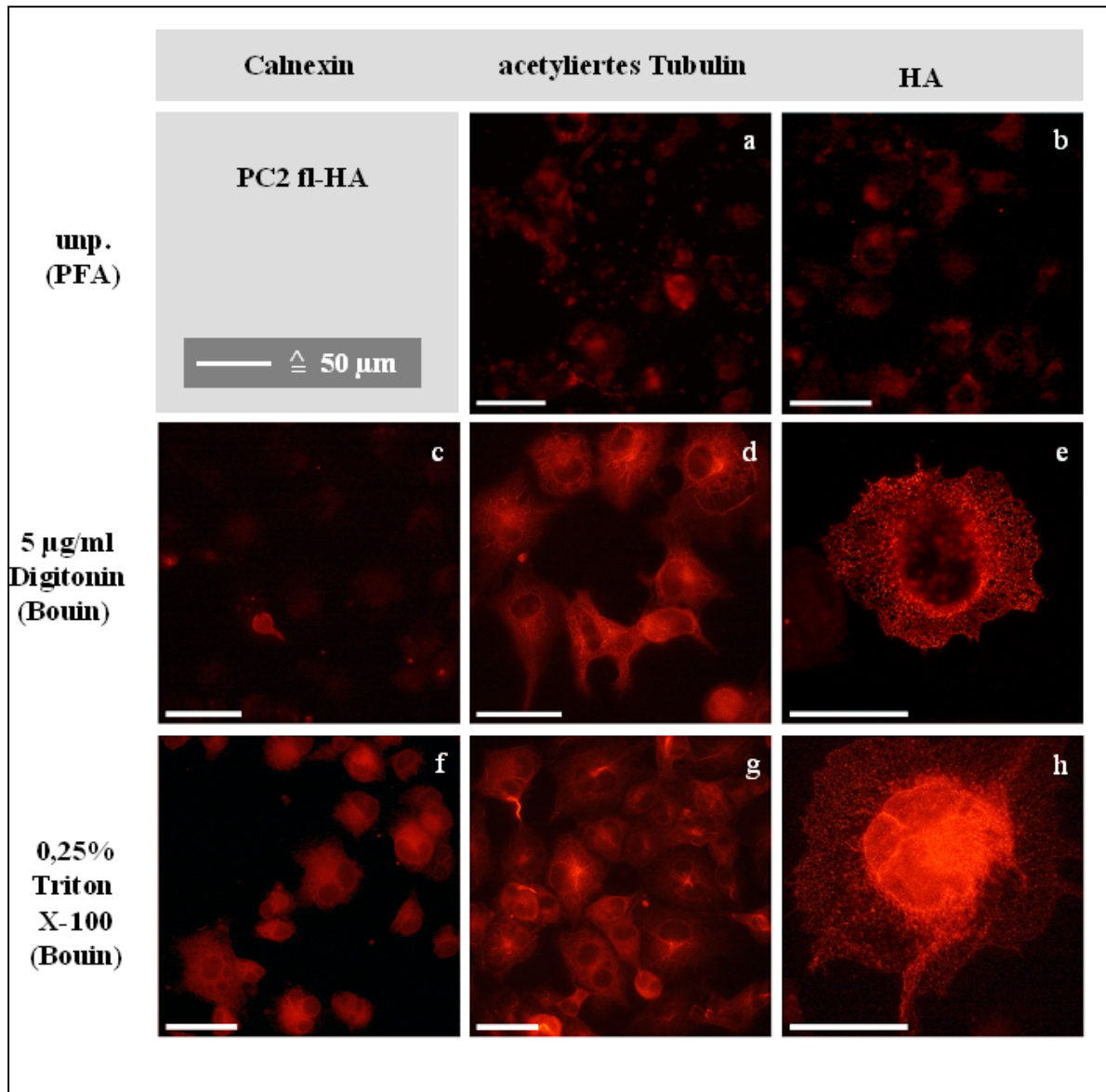


Abb. 9: Immunzytochemische Topologiebestimmung des C-Terminus von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in PFA oder Bouin fixiert. Die PFA-fixierten Zellen wurden durch Behandlung mit 1x PBS im unpermeabilisierten Zustand (**unp.**) belassen, die Bouin-fixierten Zellen wurden mit Triton X-100 (+ **0,25% Triton X-100**) oder Digitonin (+ **5 µg/ml Digitonin**) permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Die Detektion der Primärantikörper erfolgte durch Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B). Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit DMC 2-Kamera photographiert (x40), wobei für b, e und h bzw. a, d und g bzw. e und f identische Belichtungszeiten und Belichtungsstärken verwendet wurden. Um die subzelluläre Lokalisation von PC2 fl-HA besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Der C-Terminus von Polycystin-2 ragt ins Zytoplasma.**

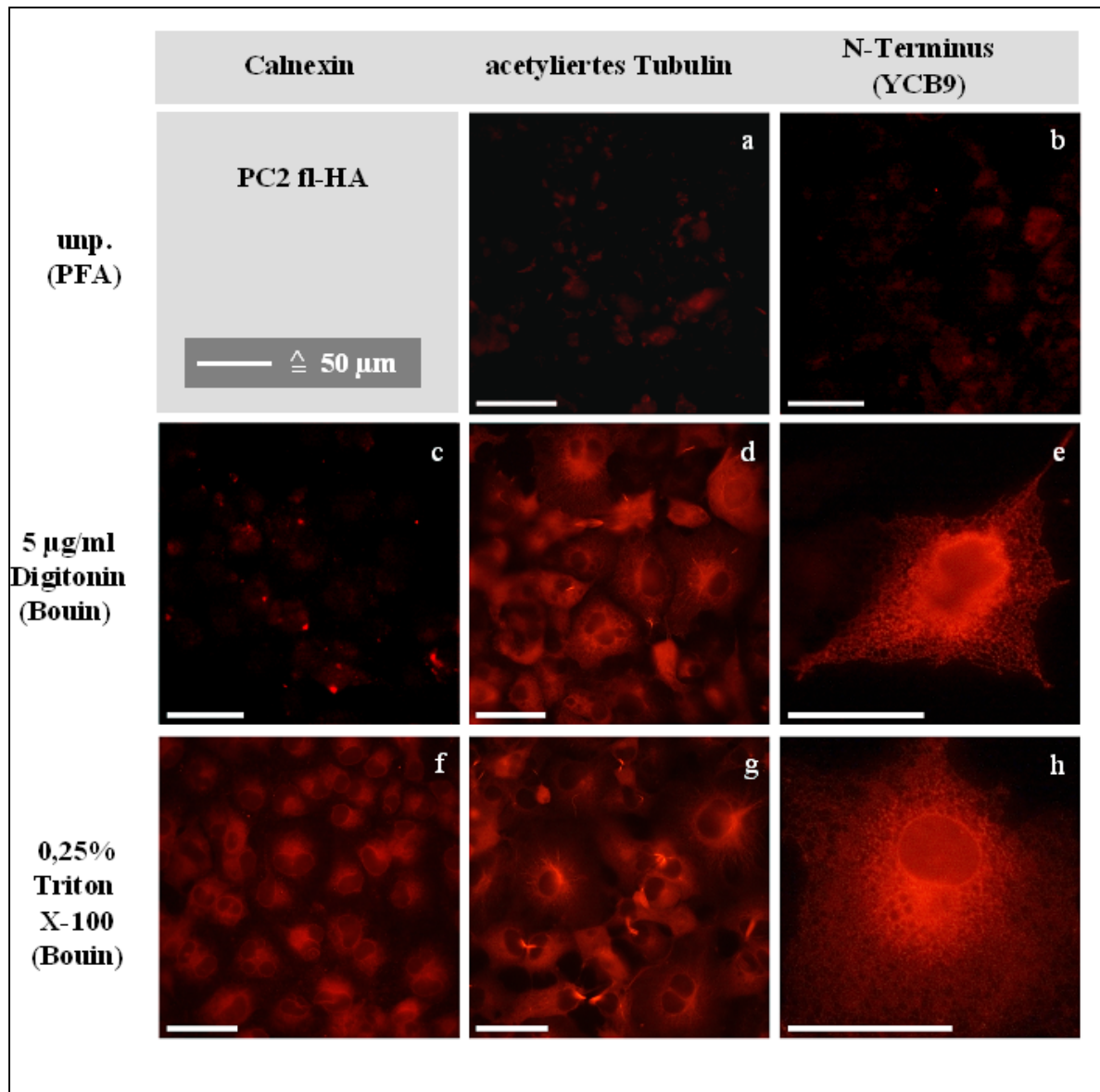


Abb. 10: Immunzytochemische Topologiebestimmung des N-Terminus von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Vorgehen wie unter Abbildung 9 erläutert. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen den N-Terminus von Polycystin-2 gerichteter Antikörper (YCB9, siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper aus Maus (siehe auch 2.1.7.A). Vorgehen wie unter Abbildung 9 erläutert. Um die subzelluläre Lokalisation von PC2 fl-HA besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Der N-Terminus von Polycystin-2 ragt ins Zytoplasma.**

Sowohl bei Abbildung 9 als auch bei Abbildung 10 ist anhand der Tubulin- und Calnexin-Kontrollen (vgl. auch Teilabb. a und c) zu erkennen, dass die Plasmamembran nach Behandlung der Zellen mit 1x PBS bzw. die ER-Membran nach Behandlung der Zellen mit Digitonin vollkommen intakt waren. Weiterhin zeigen die HA- und YCB9-Färbungen, dass der C- und N-Terminus von Polycystin-2 erst nach Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin zu detektieren sind (vgl. auch Abb. 9e und 10e), was eine zytoplasmatische Ausrichtung der beiden Domänen impliziert. Die undefinierbaren Zellgrenzen und die zytoplasmatische, perinukleär verstärkte, netzwerkartige Färbung (vgl. auch Abb. 9e, h und

10e, h) deuten dabei eine ER-Lokalisation des Proteins an, wie sie bereits von Cai et al. (1999) beschrieben wurde (vgl. auch Cedzich, 2000). Somit konnte anhand der Calnexin- und Tubulin-Kontrollen gezeigt werden, dass Zellen mit dem unter Abbildung 8 vorgestellten Versuchsschema selektiv permeabilisiert werden können. Weiterhin konnte die allseits postulierte, zytoplasmatische Ausrichtung des N- und C-Terminus von Polycystin-2 bestätigt werden. Die für den N-Terminus erhaltenen Daten stehen im Einklang zu der Beobachtung, dass bei einer plasmamembranständigen, nach Aminosäure 741 deletierten Mutante von PC2 (dieser Mutante fehlt ein ER-Retentionssignal: AS 787-820; vgl. auch Abb. 5) der N-Terminus erst nach Permeabilisierung der Zellen mit dem YCB9-Antikörper zu detektieren ist (Cai et al., 1999).

Daher sollten nun auch die restlichen, unter Abb. 5 gezeigten Proteine, einer topologischen Charakterisierung mit dieser Methode unterzogen werden. Hierzu wurden wiederum COS-7-Zellen transient mit den ersten fünf unter Abbildung 5 dargestellten Schleifen-Konstrukten transfiziert. Für die Lokalisierung der Schleifendomänen von Polycystin-2 wurde ein HA-spezifischer Antikörper (12CA5) verwendet (siehe auch Abb. 11-15b, e und h). Die Versuchsdurchführung war identisch zu derjenigen des Vorversuches mit dem PC2-Volllängenprotein.

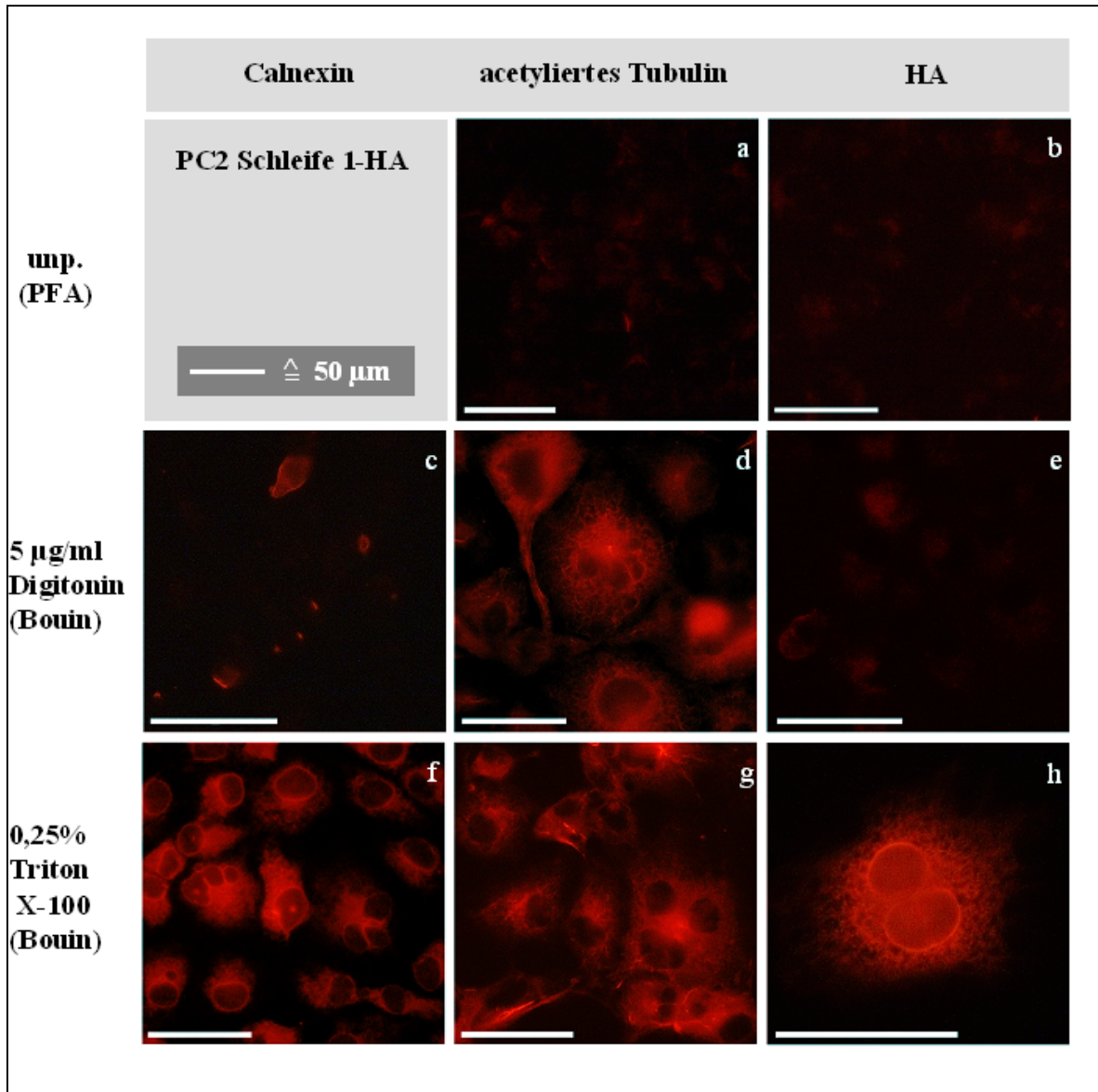


Abb. 11: Immunzytochemische Topologiebestimmung der Schleifendomäne 1 von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in PFA oder Bouin fixiert. Die PFA-fixierten Zellen wurden durch Behandlung mit 1x PBS im unpermeabilisierten Zustand (**unp.**) belassen, die Bouin-fixierten Zellen wurden mit Triton X-100 (+ **0,25% Triton X-100**) oder Digitonin (+ **5 μg/ml Digitonin**) permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Die Detektion der Primärantikörper erfolgte über Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B). Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit DMC 2-Kamera photographiert (x40), wobei für b, e und h bzw. a, d und g bzw. e und f identische Belichtungszeiten und Belichtungsstärken verwendet wurden. Um die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Schleifenmutanten besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Schleifendomäne 1 weist ins ER-Lumen.**

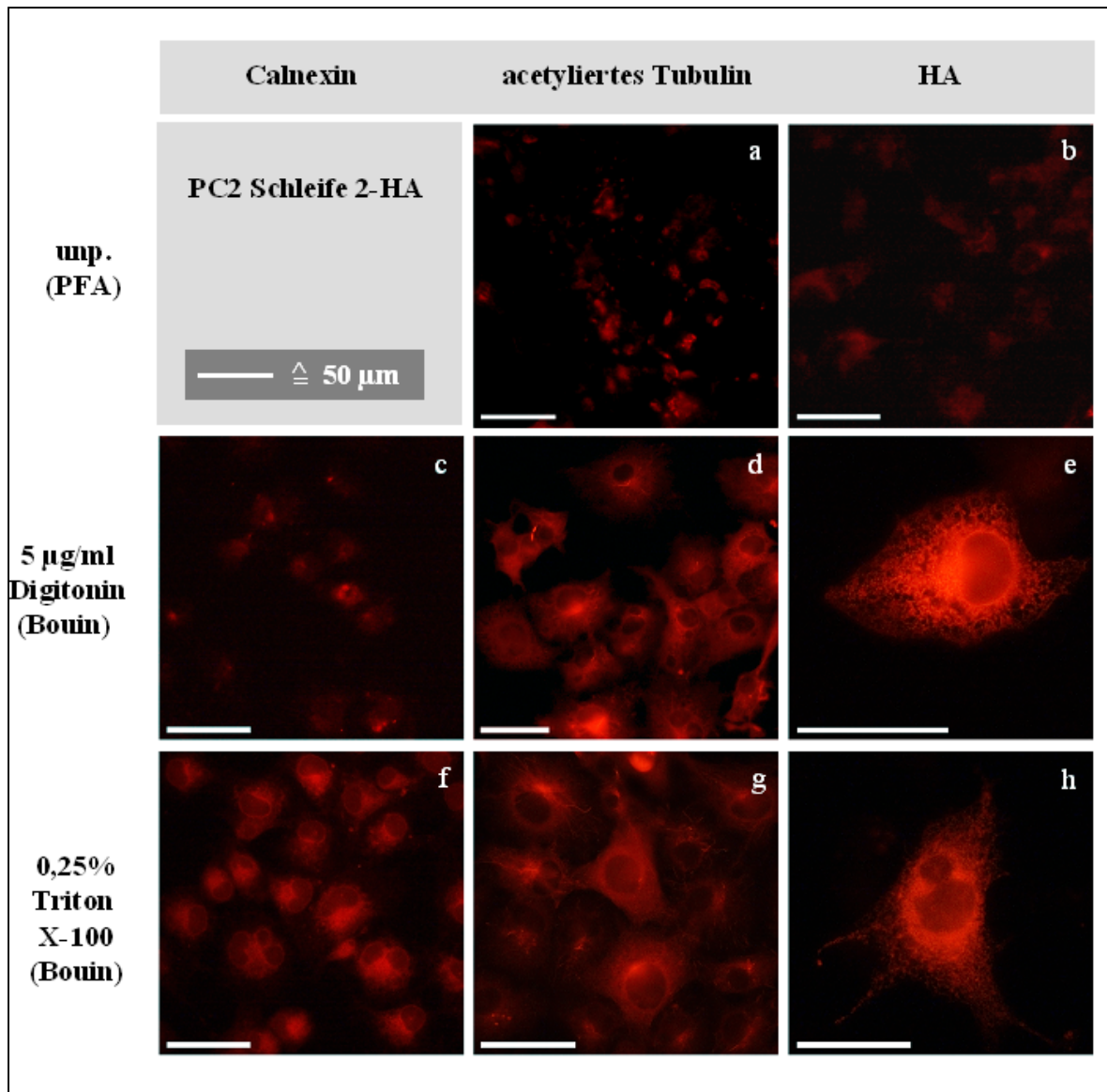


Abb. 12: Immunzytochemische Topologiebestimmung der Schleifendomäne 2 von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. Um die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Schleifenmutanten besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Schleifendomäne 2 ragt ins Zytoplasma.**

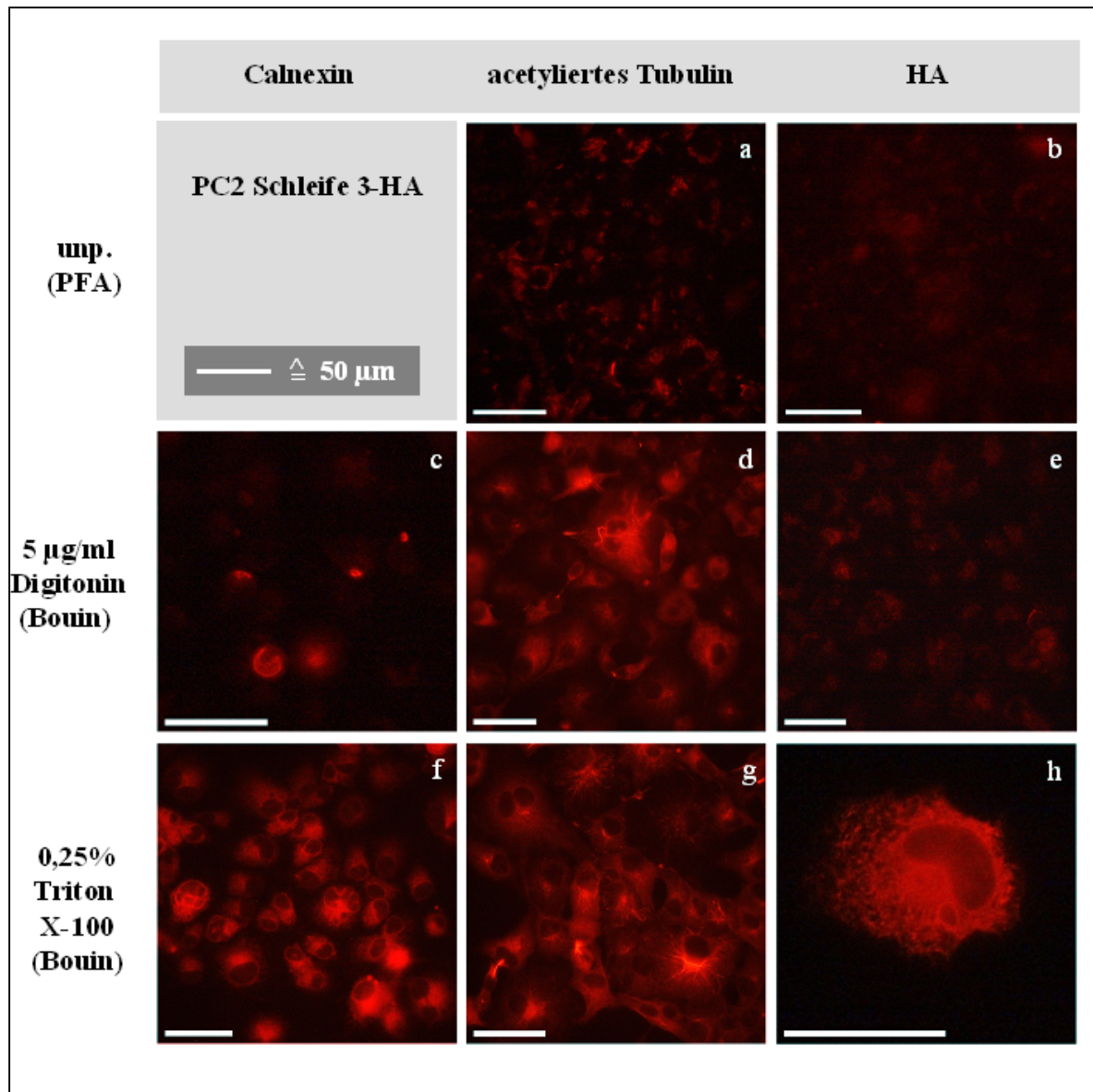


Abb. 13: Immunzytochemische Topologiebestimmung der Schleifendomäne 3 von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. Um die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Schleifenmutanten besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Schleifendomäne 3 weist ins ER-Lumen.**

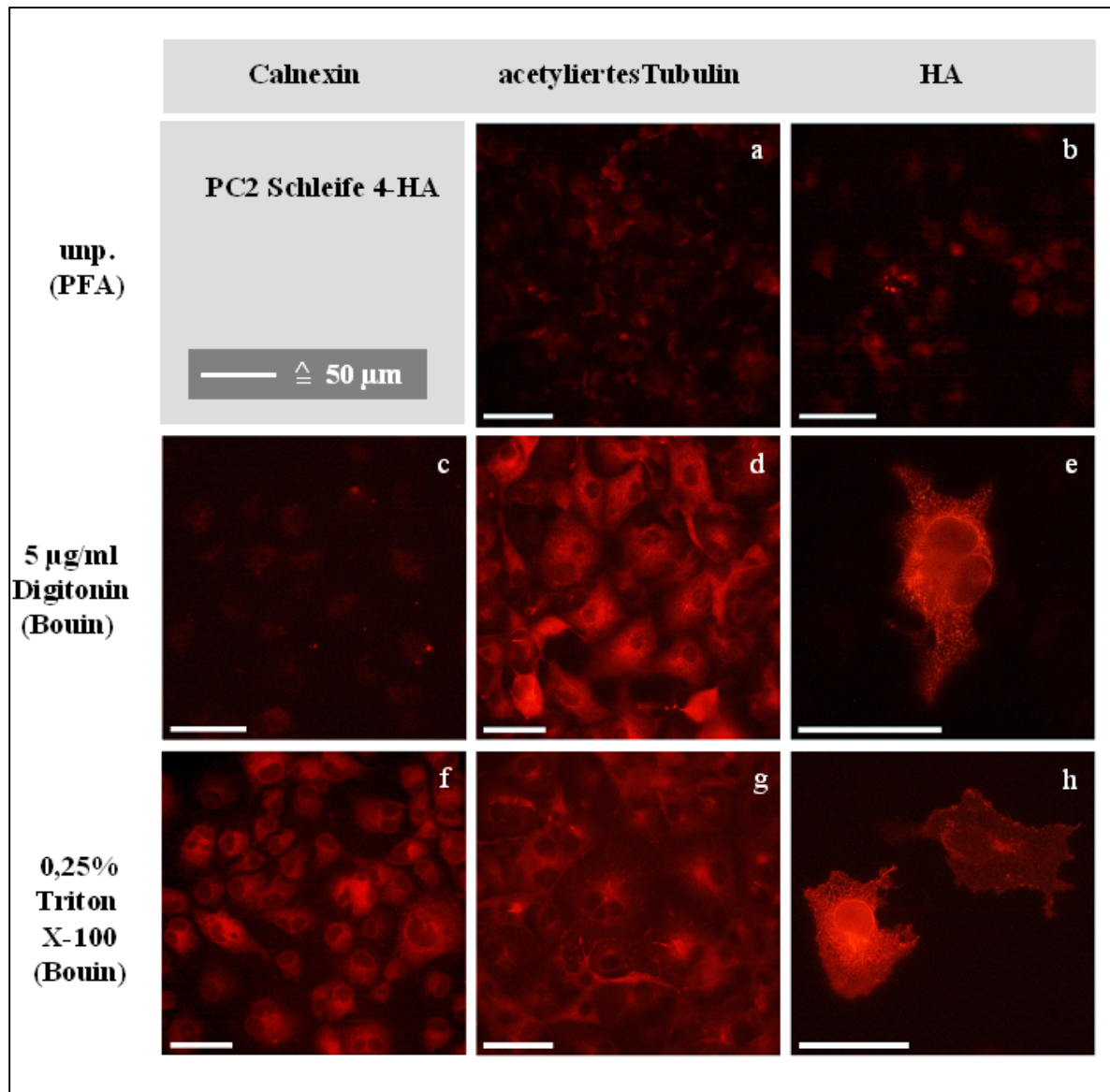


Abb. 14: Immunzytochemische Topologiebestimmung der Schleifendomäne 4 von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. Um die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Schleifenmutanten besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Schleifendomäne 4 ragt ins Zytoplasma.**

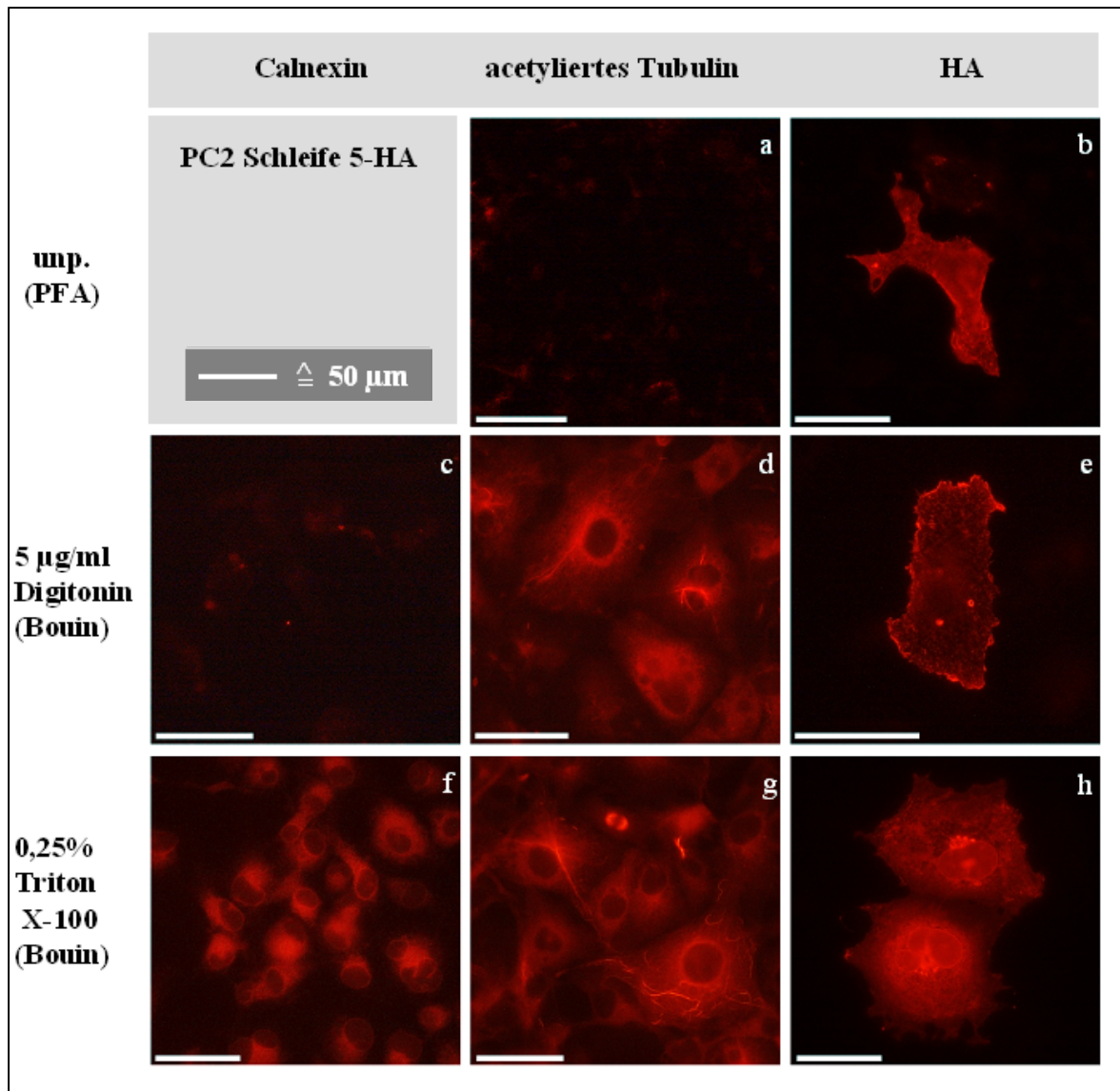


Abb. 15: Immunzytochemische Topologiebestimmung der Schleifendomäne 5 von Polycystin-2 in COS-7-Zellen mittels selektiver Membranpermeabilisierung. Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. **a, d und g:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b, e und h:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A). **c und f:** Gegen Calnexin gerichteter Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Vorgehen wie unter Abbildung 11 erläutert. Um die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Schleifenmutanten besser darzustellen, wurden die entsprechenden Bildausschnitte vergrößert dargestellt. **Schleifendomäne 5 weist nach extrazellulär.**

Anhand der Tubulin- und Calnexin-Kontrollen (vgl. auch Teilabb. a und c in Abb. 11-15) ist zu erkennen, dass die Plasmamembran nach Behandlung der Zellen mit 1x PBS bzw. die ER-Membran nach Behandlung der Zellen mit Digitonin vollkommen intakt waren. Dies macht deutlich, dass auch in dieser Versuchsreihe die in Abbildung 8 dargestellten, selektiven Permeabilisierungsstufen erzielt wurden. So ergaben die HA-Antikörperfärbungen für das Protein PC2 Schleife 5-HA, dass das Epitop bereits in unpermeabilisierten Zellen für den Antikörper zugänglich ist (vgl. Abb. 15b), was auf eine extrazelluläre Lokalisation dieser Schleifendomäne schließen lässt und noch einmal die zuvor erwähnte Translokation des Proteins zur Plasmamembran unterstreicht (vgl. auch Abb. 7c, HA). Trotz der Lokalisation

von PC2 Schleife 4-HA an der Zelloberfläche und der Retention von PC2 Schleife 2-HA im ER (vgl. auch Abb. 7a und b) sind die HA-Epitope der beiden Proteine jeweils nach der Permeabilisierung mit Digitonin detektierbar (vgl. auch Abb. 12e und 14e). Dieser Befund deutet eine zytoplasmatische Ausrichtung der untersuchten Polycystin-2-Domänen an. Im Falle von PC2 Schleife 1- und 3-HA wurde eine in das Lumen des ER gerichtete Orientierung festgestellt, da die HA-Epitope nur durch die Triton X-100-Permeabilisierung sichtbar werden (vgl. auch Abb. 11h und 13h). Für die erste Schleifendomäne konnte dabei durch ein weiteres immunzytochemisches Verfahren die extrazelluläre bzw. in das Lumen des ER gerichtete Orientierung bestätigt werden. Dabei kam ein Antikörper (Mu 50) zur Anwendung, der durch Verwendung des Aminosäurebereiches 331-343 (Schleifendomäne 1) von humanem Polycystin-2 als Immunogen entstanden ist (siehe auch 2.1.7.A). COS-7-Zellen, die eine nach Aminosäure 576 (in Schleifendomäne 4) abgeschnittene, C-terminal HA-markierte Form von Polycystin-2 [PC2(1/576)HA] transient synthetisierten, zeigten infolge der Plasmamembrantranslokation dieses Proteins bereits im unpermeabilisierten Zustand ein positives Antikörper-Signal (siehe auch Abb. 25), was impliziert, dass diese Domäne ER-luminal bzw. extrazellulär ausgerichtet sein muss.

Somit ergaben die mittels selektiver Zellmembranpermeabilisierung durchgeführten, immunzytochemischen Studien ein Topologie-Modell von Polycystin-2, das im Bezug auf die Lokalisierung der Schleifenbereiche das von Mochizuki et al. (1996) bzw. der Swissprot-Datenbank entwickelte Modell bestätigt.

B. Protease-protection-Assays zur Bestimmung der Topologie der Schleifendomänen von Polycystin-2

Um zu überprüfen, ob die durch die immunzytochemischen Experimente gewonnenen Daten zutreffend sind, wurde entschieden, sog. Protease-protection-Assays mit Mikrosomen in An- bzw. Abwesenheit von Triton X-100 durchzuführen. Bei Mikrosomen handelt es sich um Membranvesikel, die beim Homogenisieren von Zellen infolge der auftretenden Scherkräfte entstehen und einen Durchmesser von bis zu 0,1 μm haben können (Lodish et al., 1996). Die Grundlage dieses Assays beruht, wie der Name schon impliziert, auf dem Nachweis von vor einer Protease geschützten Membranprotein-Domänen in unpermeabilisierten Mikrosomen (siehe auch Abb. 16). Da eine intakte Lipiddoppelschicht impermeabel für Enzyme ist, sollten bei einem solchen Assay demnach nur diejenigen Proteinbereiche abgedaut werden, die

außerhalb der Mikrosomenmembran, zur zytoplasmatischen Seite hin, gewandt liegen (siehe auch Abb. 16). Bei Anwendung dieses Assays auf die unter Abbildung 5 gezeigten Fusionsproteine, PC2 Schleife 1-, 3- und 5-HA sollten daher geschützte Fragmente entstehen, die über das HA-Epitop detektierbar sind (siehe auch Abb. 16). Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde entschieden, die Serin-Protease Proteinase K zu verwenden, da diese nach Swissprot-Datenbank-Recherchen mit 401 möglichen Spaltstellen in Polycystin-2 deutlich mehr Spaltstellen zeigt als Trypsin, eine andere, ebenfalls bei diesem Assay-Typ recht häufig eingesetzte Protease, mit insgesamt 102 Spaltstellen in PC2. Bei Proteinase K handelt es sich um seine sog. Endopeptidase, die mit relativ geringer Spaltspezifität C-terminal von hydrophoben, aliphatischen und aromatischen Aminosäuren spaltet (Lottspeich und Zorbas, 1998).

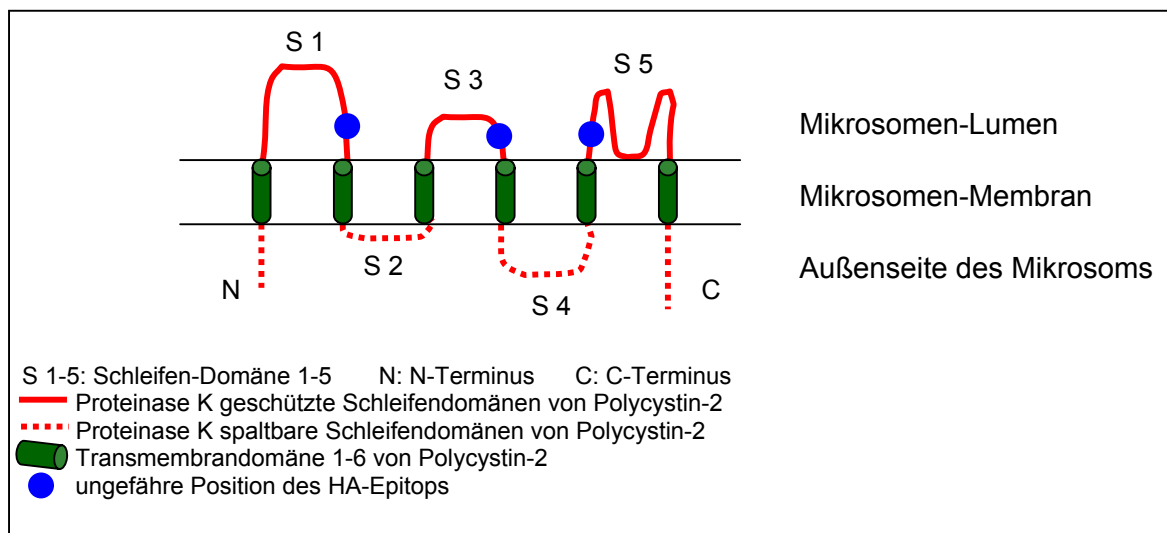


Abb. 16: Schematische Darstellung von möglichen Proteinase K-Spaltstellen in Polycystin-2 bei unpermeabilisierten Mikrosomen.

Zunächst wurde versucht, die für den Protease-Assay vorgesehenen Fusionsproteine über *in vitro* Translation in Gegenwart von Mikrosomen herzustellen. Die Translationseffizienzen mit dem Retikulozytenlysat waren jedoch so gering, dass die Proteine trotz ^{35}S -Markierung und Fluorographie-Behandlung der Gele selbst nach 1-wöchiger Filmexposition bei -80°C kaum sichtbar waren (Daten nicht gezeigt). Daher wurde entschieden, die für den Assay notwendigen Mikrosomen direkt aus Säugerzellen zu gewinnen.

Hierzu wurden COS-7-Zellen mit den für die Proteine PC2 Schleife 1-, 3- und 5-HA kodierenden Konstrukten (vgl. auch Abb. 5) transient transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde eine Mikrosomenpräparation durchgeführt (siehe auch 2.2.2.H),

an deren Ende die eine Hälfte der gewonnenen Mikrosomen in einem Triton X-100-haltigen Puffer und die andere Hälfte in einem entsprechenden Puffer ohne Triton X-100 resuspendiert wurden (siehe auch 2.2.2.I). Danach erfolgte eine Inkubation der unpermeabilisierten bzw. permeabilisierten Membranvesikel in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K (PK). Nach Abstoppen des Verdaus mit PMSF wurden die Triton X-100-freien Proben permeabilisiert. Anschließend wurden alle Reaktionen einer Immunpräzipitation mit einem HA-spezifischen Antikörper (12CA5, aus Maus, vgl. auch 2.1.7.A) unterzogen, wobei die Überstände der in SDS-Probenpuffer resuspendierten Beads im Western-Blot mit einem HA-Antikörper (3F10, aus Ratte, vgl. auch 2.1.7.A) analysiert wurden. Ein Kontrollansatz, bestehend aus der im Assay eingesetzten Höchstmenge an Proteinase K und dem Triton X-100-freien Puffer sollte gewährleisten, dass die im Blot detektierten geschützten Fragmente keinesfalls vom immunologischen Nachweis der Protease selbst herrühren. Um gleichzeitig die Intaktheit der Mikrosomen überprüfen zu können, wurden die Überstände nach der Immunpräzipitation einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen das ER-luminale Chaperon Calreticulin gerichteten Antikörper unterzogen (siehe auch Abb. 17-20).

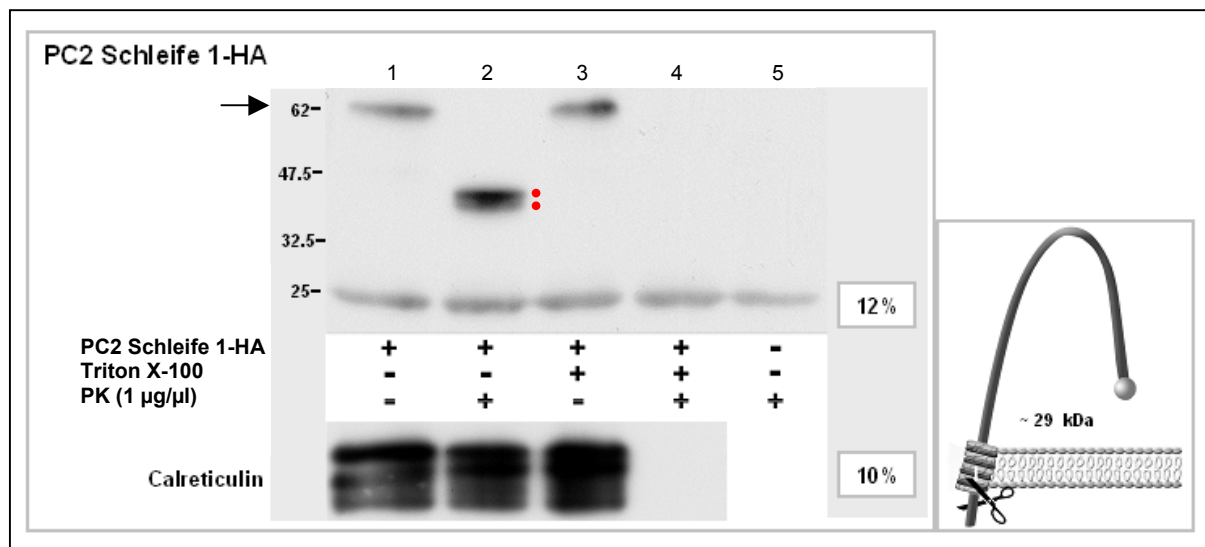


Abb. 17: Proteinase K-Verdau für PC2 Schleife 1-HA mit angeschlossener Immunpräzipitation. 48 Stunden nach der Transfektion wurden aus transient transfizierten COS-7-Zellen Mikrosomen präpariert (s. auch 2.2.2.H). Anschließend wurden die unpermeabilisierten (-Triton X-100) bzw. permeabilisierten (+Triton X-100) Mikrosomen in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K (+/- PK) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktionen mit PMSF wurden die Triton X-100-freien Proben permeabilisiert. Anschließend wurden alle Proben mit 12CA5 (= anti-HA-Antikörper)-gekoppelten Sepharose A-Beads einer Immunpräzipitation unterzogen (2.2.2.I). **Oberer Blot:** Die Beads wurden in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei die gesamten 30 µl auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. 2.2.4.D), welche mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10; s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. **Unterer Blot:** Gleiche Volumina (60 µl) der Überstände wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. auch 2.2.4.D), die mit einem gegen Calreticulin gerichteten Antikörper (s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D). **Der Proteinase K-Verdau von unpermeabilisierten Mikrosomen mit PC2 Schleife 1-HA (siehe Pfeil) erzeugt ein geschütztes Fragment (siehe roter Doppelpunkt) von ~40 kDa.**

Betrachtet man die Calreticulin-Banden in Abbildung 17, so wird deutlich, dass die verwendeten Mikrosomen intakt waren, da die Mikrosomenfraktionen in Spur 1-3 (unterer Blot in Abb. 17) ein Calreticulin-Signal mit vergleichbarer Bandenintensität aufweisen. Bei den mit Triton X-100 und Proteinase K behandelten Mikrosomen in Spur 4 ist hingegen keine Calreticulin-Bande mehr zu detektieren, da das Chaperon infolge der Permeabilisierung durch die Protease abgedaut wurde. Entsprechend der von Mochizuki et al. (1996) und der unter 3.1.1 postulierten ER-luminalen Ausrichtung von Schleifendomäne 1 (vgl. auch Abb. 11h), ist in der mit Proteinase K behandelten unpermeabilisierten Mikrosomenfraktion ein geschütztes Fragment zu erkennen (vgl. auch Abb. 17, Spur 2, roter Doppelpunkt). Mit einer Laufhöhe zwischen 32,5 und 47,5 kDa liegt das HA-markierte Spaltprodukt von PC2 Schleife 1-HA allerdings weit über dem nach Swissprot-Datenbank-Recherchen ermittelten Molekulargewicht von 29 kDa (vgl. Abb. 17, Spur 2). Als Ausgangspunkt für die Berechnung wurde dabei eine von der Datenbank ermittelte Proteinase K-Schnittstelle an Aminosäure-Position 221 (N-Terminus) herangezogen, die 2 bzw. 3 Aminosäuren vor dem Beginn der potentiellen ersten Transmembrandomäne entfernt liegt (siehe auch Abb. 4). Würde der Start der ersten Transmembrandomäne nun aber nicht wie postuliert bei AS 224 bzw. 225 (siehe auch Abb. 4) sondern viel weiter N-terminal liegen, so würde dies theoretisch zu einem sichtbar langsameren Laufverhalten des Spaltproduktes im Gel führen. Dieses Argument erscheint jedoch im Hinblick auf das Molekulargewicht des ungespaltenen Proteins (siehe Pfeil, Abb. 17), das vermutlich infolge mehrfacher *N*-Glykosylierung (Mochizuki et al., 1996) fast 10 kDa über dem errechneten Wert von ~62 kDa liegt (s. auch Abb. 6 und Abb. 17, Spur 1 und Abb. 5), als eher unwahrscheinlich. Es ist daher anzunehmen, dass der genannte posttranslationale Modifikationsprozess auch die Ursache dafür ist, warum das vor der Protease geschützte Fragment in der unpermeabilisierten und mit Proteinase K behandelten Mikrosomen-Fraktion in Form von 2 eng aufeinanderfolgenden Banden (Abb. 17, Spur 2 roter Doppelpunkt; vgl. auch Abb. 18, Spur 3) mit unerwartet hohem Molekulargewicht läuft. Es kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die Doppelbande nicht auch aus der präferentiellen Spaltung von Proteinase K an 2 eng benachbarten N-terminalen Schnittstellen herrührt.

Um daher zu überprüfen, ob *N*-Glykosylierung als eine Form der posttranslationalen Modifizierung von Membranproteinen den Grund für die deutlich erhöhten Molekulargewichte von ungespaltenem PC2 Schleife 1-HA-Protein und seinem Spaltprodukt darstellt, wurde entschieden, einen PNGase F-assay durchzuführen. Bei PNGase F handelt es

sich um das Enzym Peptid-N⁴-(N-acetyl-β-glucosaminyl)asparagin-Amidase aus *Flavobacterium meningosepticum*. Diese Enzym spaltet alle N-glykosidischen Bindungen zwischen dem „proximalen GlcNAc“ (dem Ankerzucker) und der Aminosäure Asparagin (Lottspeich und Zorbas, 1998). Behandelt man N-glykosylierte Proteine mit diesem Enzym, dann zeigen diese im Gel eine Verschiebung der Laufhöhe zu niedrigeren Molekulargewichtsgrößen hin, wohingegen die unbehandelten Proteine unverändert laufen.

Für diesen Versuch wurden wieder Mikrosomen nach der bereits erläuterten Methode aus transient transfizierten COS-7-Zellen gewonnen, wobei diesmal nur unpermeabilisierte Mikrosomen zum Einsatz kamen (siehe auch 2.2.2.I). Der Proteinase K-Verdau wurde mit der doppelten Menge an PMSF abgestoppt, um das Risiko eines Proteinase K-Abdaues bei den im Anschluß durchgeführten Schritten zu minimieren, da das Enzym in einem relativ breiten Temperaturspektrum aktiv ist (Temperaturoptimum 65°C). Nach der Denaturierung der Proben mit einem SDS- und β-Mercaptoethanol-haltigen Puffer bei 100°C erfolgte dann die eigentliche Deglykosylierungsreaktion mit PNGase F bei 37°C (siehe auch 2.2.2.L). Hierzu wurden die jeweiligen Reaktionen halbiert, wobei der eine Volumenteil in Anwesenheit und der andere Volumenteil in Abwesenheit des deglykosylierenden Enzymes inkubiert wurde. Danach erfolgte die Immunpräzipitation der Proben und es wurde wie unter Abbildung 17 beschrieben weiterverfahren. Das Resultat des Versuches ist in Abbildung 18 zu sehen.

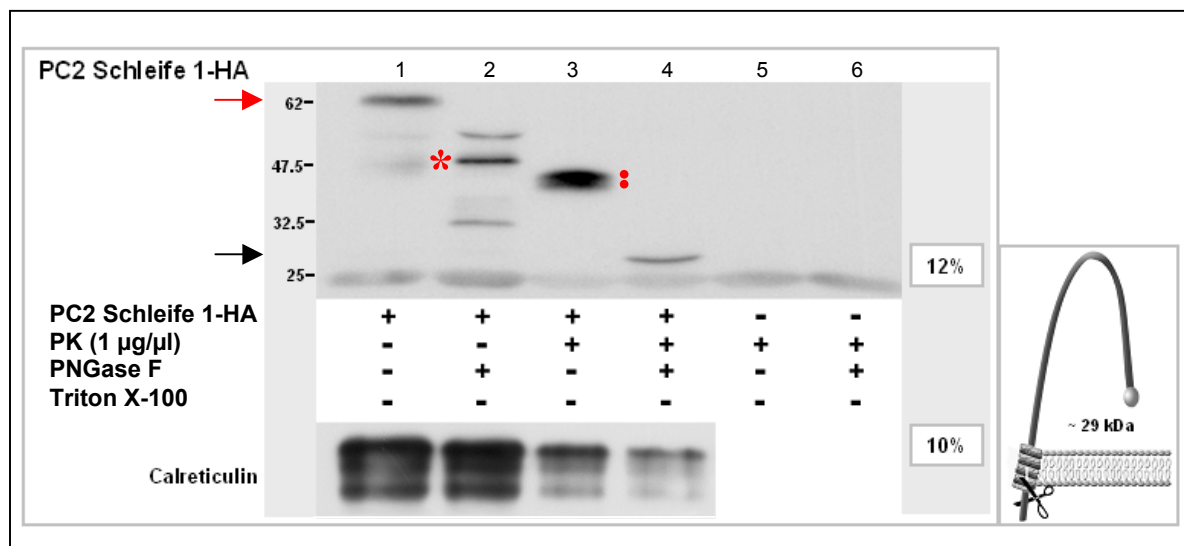


Abb. 18: Proteinase K-Verdau und Deglykosylierungsreaktion für PC2 Schleife 1-HA mit anschließender Immunpräzipitation. 48 Stunden nach der Transfektion wurden aus transient transfizierten COS-7-Zellen Mikrosomen präpariert (s. auch 2.2.2.H). Anschließend wurden die unpermeabilisierten (-Triton X-100) Mikrosomen in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K (+/- PK) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktionen mit PMSF wurden die Proben denaturiert und in An- bzw. Abwesenheit von PNGase F (+/- PNGase F) inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 12CA5 (= anti-HA-Antikörper)-gekoppelten Sepharose A-Beads einer Immunpräzipitation unterzogen (2.2.2.I). **Oberer Blot:** Die Beads wurden in 30 µl 2x SDS-

Probenpuffer resuspendiert, wobei die gesamten 30 µl auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. 2.2.4.D), welche mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10; s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. **Unterer Blot:** Gleiche Volumina (80 µl) der Überstände wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. auch 2.2.4.D), die mit einem gegen Calreticulin gerichteten Antikörper (s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D). Die deglykosylierten Formen von PC2 Schleife 1-HA und dessen Spaltprodukt sind durch einen roten Stern bzw. schwarzen Pfeil markiert. **PC2 Schleife 1-HA (roter Pfeil) und sein Spaltprodukt (siehe roter Doppelpunkt) sind N-glykosyliert, da sie erst nach PNGase F-Behandlung auf der erwarteten Molekulargewichtshöhe im SDS-Gel laufen.**

Bei Betrachtung der Calreticulin-Kontrollen fällt auf, dass im Falle der mit Proteinase K behandelten Proben die Banden deutlich schwächer ausgeprägt sind als bei den unbehandelten Proben (vgl. Spur 1-4 in Abb. 18). Die Bande bei der mit PNGase F und Proteinase K inkubierten Mikrosomenfraktion scheint sogar noch etwas schwächer zu sein als diejenige bei der nur mit Proteinase K behandelten Fraktion (vgl. auch Abb. 18, Spur 4 und 3). Eine Erklärung hierfür ist, dass trotz der zusätzlichen Menge an PMSF nicht verhindert werden konnte, dass Calreticulin vermutlich bei dem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 100°C oder dem Deglykosylierungsschritt bei 37°C (oder evtl. auch später) größtenteils durch Proteinase K abgedaut wurde. Nichtsdestotrotz zeigt der Blot recht deutlich, dass das ungespaltene PC2 Schleife 1-HA-Protein (siehe roter Pfeil, Abb. 18) sowie sein Spaltprodukt (siehe roter Doppelpunkt, Abb. 18) massiv glykosyliert sind (vgl. auch Abb. 18, Spur 1-4). So läuft das vor der Protease geschützte Fragment nach Behandlung mit PNGase F auf der nach Datenbank-Recherchen errechneten Molekulargewichtshöhe von 29 kDa (vgl. Abb. 18, Spur 4, schwarzer Pfeil). Die Tatsache, dass die deglykosylierte Form des Fragmentes nur noch als eine Bande läuft, spricht dafür, dass die Doppelbande (siehe roter Doppelpunkt) in Spur 3 (Abb. 18; vgl. auch Abb. 17, Spur 2) wohl eher zwei verschiedene Glykosylierungsstufen repräsentiert und nicht durch Spaltung an 2 Schnittstellen entstanden ist (auch nach längerer Exposition war keine zweite Bande höheren bzw. niedrigeren Molekulargewichtes zu erkennen).

Neben dem Spaltprodukt ist auch bei dem ungespaltenen Protein ein Molekulargewichtsshift in Folge der Deglykosylierung zu beobachten. So sind in der mit PNGase F behandelten Vesikelfraktion des ungespaltenen PC2 Schleife 1-HA-Proteins zum einen eine Bande ungefähr auf der erwarteten Molekulargewichtshöhe von ~52,5 kDa (Abb. 18, Spur 2: roter Stern; vgl. auch Abb. 5) und eine etwas weniger intensive Bande höheren Molekulargewichtes zu sehen (vgl. Abb. 18, Spur 2). Letztere könnte daher eine Zwischenstufe der Deglykosylierung darstellen. Die ebenfalls in dieser Gelspur im Bereich von ~32,5 kDa verlaufende Bande deutet auf eine deglykosylierte Abbaubande hin, die

eventuell von der unterhalb der glykosylierten, ungespaltenen PC2 Schleife 1-HA-Proteinbande (Abb. 18, Spur 1 ~47.5 kDa) verlaufenden Bande herrührt. Zusammenfassend kann man demnach festhalten, dass die durch Mochizuki et al. (1996) postulierte Glykosylierung von Schleifendomäne 1 einen erheblichen Einfluss auf das Molekulargewicht von PC2 Schleife 1-HA und dessen Spaltfragment hat. Nach Entfernen der Zuckerreste laufen beide Proteine auf Höhe der errechneten Molekulargewichtsgrößen, so dass *N*-Glykosylierung der maßgebliche Grund für das unerwartet hohe Molekulargewicht des geschützten Fragmentes im Falle von PC2 Schleife 1-HA zu sein scheint.

Um nun für die beiden anderen Schleifendomänen 3 und 5 die postulierte, ER-luminale Ausrichtung zu überprüfen, wurde auch in diesen Fällen eine Mikrosomenpräparation nach dem weiter oben beschriebenen Muster (siehe auch 2.2.2.I) durchgeführt (Abb. 19 und 20).

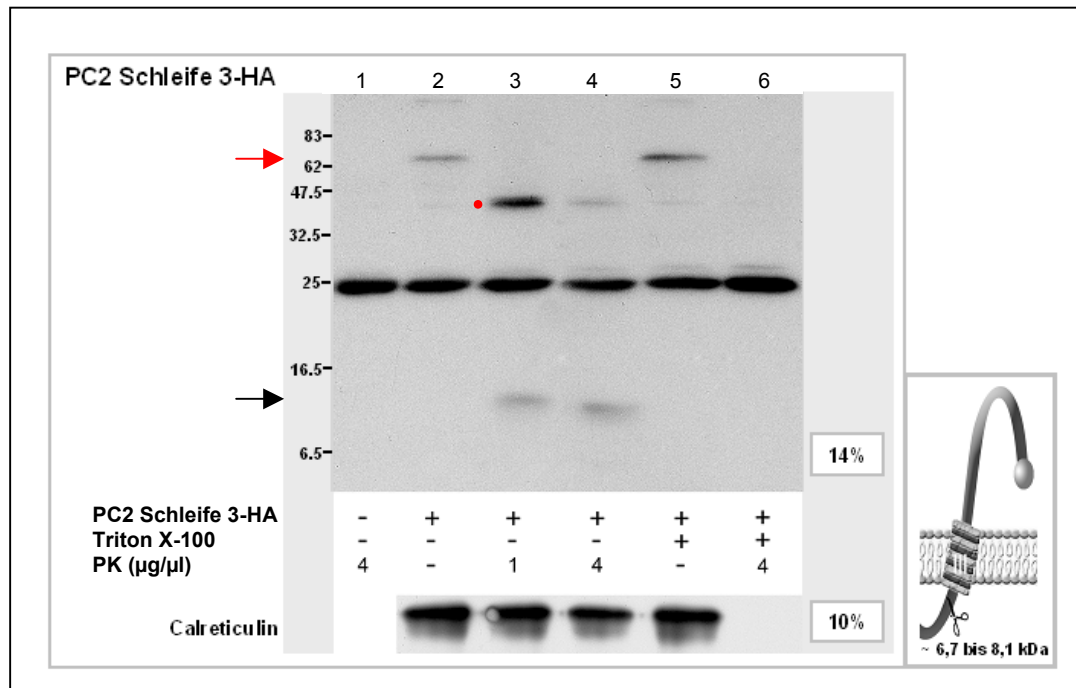


Abb. 19: Proteinase K-Verdau für PC2 Schleife 3-HA mit angeschlossener Immunpräzipitation. 48 Stunden nach der Transfektion wurden aus transient transfizierten COS-7-Zellen Mikrosomen präpariert (s. auch 2.2.2.H). Anschließend wurden die unpermeabilisierten (-Triton X-100) bzw. permeabilisierten (+Triton X-100) Mikrosomen in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K (+/- PK) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktionen mit PMSF wurden die Triton X-100-freien Proben permeabilisiert. Anschließend wurden alle Proben mit 12CA5 (= anti-HA-Antikörper)-gekoppelten Sepharose A-Beads einer Immunpräzipitation unterzogen (2.2.2.I). **Oberer Blot:** Die Beads wurden in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei die gesamten 30 µl auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. 2.2.4.D), welche mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10; s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. **Unterer Blot:** Gleiche Volumina (60 µl) der Überstände wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. auch 2.2.4.D), die mit einem gegen Calreticulin gerichteten Antikörper (s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D.). Der rote Pfeil markiert das ungespaltene PC2 Schleife-3HA-Protein. **Proteinase K setzt bei unpermeabilisierten PC2 Schleife 3-HA-Mikrosomen ein Fragment im Bereich von 6,7-8,1 kDa (siehe schwarzer Pfeil) und ein Fragment von ~40 kDa (siehe roter Punkt) frei.**

Mit Hilfe der Calreticulin-Banden konnte auch für den PC2 Schleife 3-HA-Versuch die Intaktheit der verwendeten Mikrosomenpräparation gewährleistet werden. Wie bei PC2 Schleife 1-HA in Abbildung 17, so ist auch für PC2 Schleife 3-HA (Abb. 19, roter Pfeil) ein vor der Protease geschütztes Fragment zu beobachten (Abb. 19, Spur 3: schwarzer Pfeil), das im erwarteten Größenbereich von 6,7 bis 8,1 kDa liegt. Als Berechnungsgrundlage wurden dabei die an AS-Position 492 und 503 angegebenen Spaltstellen herangezogen, die 2 bzw. 4 oder 13 bzw. 15 Aminosäuren vor dem Start der potentiellen dritten Transmembrandomäne liegen (siehe auch Abb. 4). Die ebenfalls in Gelspur 3 (Abb. 19) zu sehende Bande, zwischen 32,5 und 47,5 kDa (siehe roter Punkt), scheint hinsichtlich des Molekulargewichtes im Bereich der Fragmentgröße des PC2 Schleife1-HA-Spaltproduktes (siehe auch Abb. 17 und 18) zu liegen und somit durch Spaltung von PC2 Schleife 3-HA im N-Terminus entstanden zu sein. Eine Erhöhung der Proteinase K-Konzentration um das Vierfache führt zwar nicht zur vollständigen, so aber doch zu einer deutlich sichtbaren Verminderung des etwa 40 kDa großen Spaltproduktes (siehe Abb. 19, Spur 4). Gleichzeitig ist eine Verschiebung des kleineren Spaltproduktes (im Bereich von 6,7-8,1 kDa) zu niedrigeren Molekulargewichtsgrößen hin zu beobachten (Abb. 19, Spur 3 und 4), was im Hinblick auf die Calreticulin-Kontrollen wohl nicht auf einen N-terminalen Verdau in Folge einer Penetration der Mikrosomen durch die Protease zurückzuführen ist. Da auch diese Fragmentgröße durchaus im erwarteten Molekulargewichtsbereich liegt, ist anzunehmen, dass durch eine Erhöhung der Proteasemenge die Wahrscheinlichkeit für das Enzym erhöht wurde, noch weiter C-terminal als zuvor in der zweiten Schleifendomäne angreifen zu können.

Auch für Schleifendomäne 5 von Polycystin-2 konnte mittels Protease-protection-Assay die postulierte Ausrichtung in das Lumen des ER bestätigt werden (siehe auch Abb. 20). So ist bei Zugabe von Proteinase K zu der unpermeabilisierten Mikrosomenfraktion von PC2 Schleife 5-HA (Abb. 20, Pfeil) ein vor der Protease geschütztes Fragment in dem errechneten Größenbereich von 4,7-7,7 kDa zu beobachten (Abb. 20, Spur 2, roter Stern), wobei als mögliche Spaltstellen die Aminosäuren an Position 598 und 573 in Frage kommen, die jeweils unmittelbar vor bzw. 25 Aminosäuren entfernt von dem Start der potentiellen fünften Transmembrandomäne liegen (vgl. auch Abb. 4). Die Calreticulin-Kontrolle zeigt auch hier, dass die für den Assay eingesetzte Mikrosomenpräparation intakt war (vgl. Abb. 20, Spur 1-3).

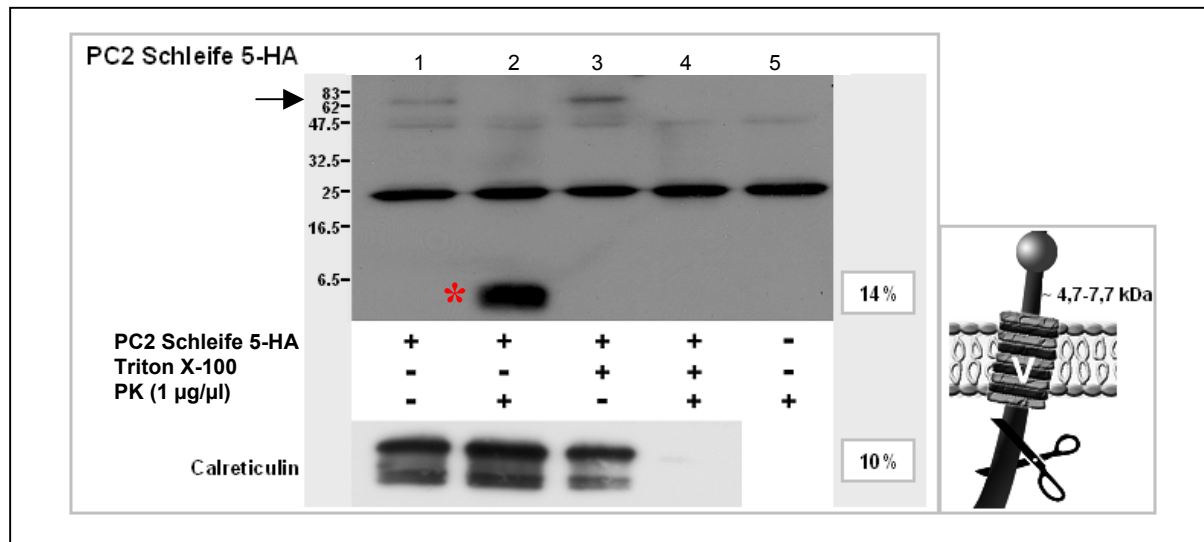


Abb. 20: Proteinase K-Verdau für PC2 Schleife 5-HA mit angeschlossener Immunpräzipitation.

48 Stunden nach der Transfektion wurden aus transient transfizierten COS-7-Zellen Mikrosomen präpariert (s. auch 2.2.2.H). Anschließend wurden die unpermeabilisierten (-Triton X-100) bzw. permeabilisierten (+Triton X-100) Mikrosomen in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K (+/- PK) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktionen mit PMSF wurden die Triton X-100-freien Proben permeabilisiert. Anschließend wurden alle Proben mit 12CA5 (= anti-HA-Antikörper)-gekoppelten Sepharose A-Beads einer Immunpräzipitation unterzogen (2.2.2.I). **Oberer Blot:** Die Beads wurden in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei die gesamten 30 µl auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. 2.2.4.D), welche mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10; s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. **Unterer Blot:** Gleiche Volumina (60 µl) der Überstände wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. auch 2.2.4.D), die mit einem gegen Calreticulin gerichteten Antikörper (s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D). **Proteinase K setzt beim Verdau von unpermeabilisierten Mikrosomen mit PC2 Schleife 5-HA (siehe Pfeil) ein Fragment frei, das kleiner als 6,5 kDa ist (siehe roter Stern).**

Zusammenfassend betrachtet bestätigen die Daten aus dem Protease-protection-Assay recht eindeutig, dass die Schleifendomänen 1, 3 und 5 ER-luminal bzw. extrazellulär ausgerichtet sein müssen, da bei allen 3 Schleifenregionen ein geschütztes Fragment im Western-Blot detektiert werden konnte, das den per Datenbank-Recherchen ermittelten Molekulargewichtsgrößen entsprach. Im Falle des Spaltproduktes von PC2 Schleife 1-HA konnte das ermittelte Molekulargewicht erst über den Umweg einer Deglykosylierung erreicht werden, was jedoch noch einmal die ER-luminale Ausrichtung dieser Region untermauert, da N-Glykosylierung nur innerhalb des ER stattfinden kann. Hierbei sollte noch erwähnt werden, dass das Spaltprodukt von PC2 Schleife 1-HA auch durch Verwendung eines gegen den Aminosäurebereich 349-361 (Schleifendomäne 1) gerichteten Antikörpers (Mu12; siehe auch 2.1.7.A) im Western-Blot erkannt wurde (Daten nicht gezeigt).

Im Umkehrschluss zeigt der Nachweis der geschützten Fragmente im Falle von PC2 Schleife 3- und 5-HA aber auch, dass die Schleifendomänen 2 und 4 zytoplasmawärts liegen müssen. Um dies zu verifizieren, wurden sowohl für PC2 Schleife 2-HA als auch für PC2 Schleife 4-

HA Protease-protection-Assays durchgeführt. Die Mikrosomenpräparationen hierzu folgten dem bereits weiter oben erläuterten Protokoll (siehe auch 2.2.2.H), wobei in diesem Fall die Proben ohne vorherige Immunpräzipitation einer Western-Blot-Analyse mit einem HA-spezifischen Antikörper (12CA5, aus Maus) unterzogen wurden (Abb. 21). Der Nachweis von Calreticulin zur Überprüfung der Intaktheit der Mikrosomen erfolgte durch eine Reinkubation der Membran mit dem entsprechenden Antikörper (aus Kaninchen). Die Ergebnisse aus diesen Versuchen werden am Assay für PC2 Schleife 2-HA exemplarisch dargestellt (Abb. 21).

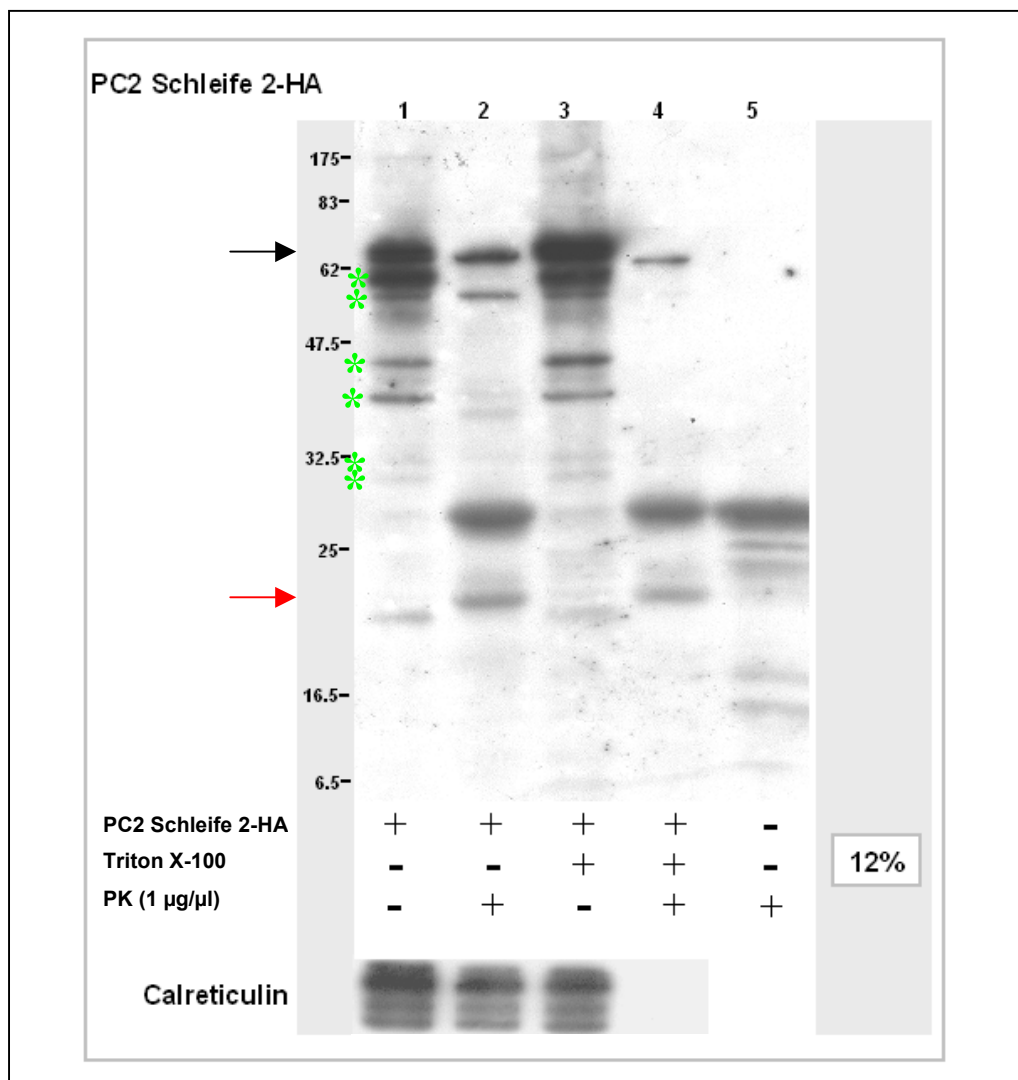


Abb. 21: Proteinase K-Verdau für PC2 Schleife 2-HA. 48 Stunden nach der Transfektion wurden aus transient transfizierten COS-7-Zellen Mikrosomen präpariert (s. auch 2.2.2.H). Die unpermeabilisierten (-**Triton X-100**) bzw. permeabilisierten (+**Triton X-100**) Mikrosomen (jeweils 1/3 der Gesamtmenge) wurden anschließend in An- bzw. Abwesenheit von Proteinase K (+/- **PK**) inkubiert. Danach wurden die Reaktionen mit PMSF abgestoppt. **Oberer Blot:** Die Reaktionen (80 µl) wurden auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (s. 2.2.4.D), welche mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (12CA5; s. auch 2.1.7.A) inkubiert wurde. **Unterer Blot:** Reinkubation der Membran mit einem gegen Calreticulin gerichteten Antikörper (s. auch 2.1.7.A) Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D). Die mit einem grünen Stern markierten Banden repräsentieren einen Teil der Hintergrundbanden, die durch unspezifische

Detektion von Proteinen aus der Mikrosomenpräparation durch den anti-HA-Antikörper hervorgerufen werden (Daten nicht gezeigt). Der schwarze Pfeil markiert das ungespaltene PC2 Schleife 2-HA. Der rote Pfeil markiert Spaltfragmente beim Verdau von PC2 Schleife 2-HA (bzw. PC2 Schleife 4-HA, siehe weiter unten) mit unbekanntem Ursprung. **Der Proteinase K-Verdau von PC2 Schleife 2-HA-Mikrosomen setzt kein geschütztes Fragment frei.**

Trotz der unvollständigen Spaltung von PC2 Schleife 2-HA (siehe Abb. 21, Spur 2 und 4, schwarzer Pfeil) kann festgehalten werden, dass die Intensität der Bande der Deletionsmutante von Polycystin-2 bei Zugabe von Proteinase K zu unpermeabilisierten Mikrosomen deutlich geringer wird. Weiterhin ist anzumerken, dass im Vergleich zu den unter Abbildung 17-20 dokumentierten Versuchen keine prominente Bande für ein geschütztes Fragment zu sehen ist. Aufgrund der Hintergrundbanden (z.T. markiert durch grüne Sterne in Spur 1, Abb. 21), die aus der unspezifischen Detektion von Proteinen aus der Mikrosomenpräparation durch den anti-HA-Antikörper herrühren (Daten nicht gezeigt), kann über die Herkunft der Fragmente in Spur 2 und 4 (Abb. 21, roter Pfeil), die im übrigen auch bei einem entsprechend durchgeführten Versuch für PC2 Schleife 4-HA auftraten (Daten nicht gezeigt), nur spekuliert werden. Somit ist anzunehmen, dass die zweite Schleifendomäne wie postuliert ins Zytoplasma ragt. Die Calreticulin-Kontrolle gewährleistet dabei, dass die gewonnenen Daten an intakten Mikrosomen erhoben wurden. Für PC2 Schleife 4-HA ergab sich bei dieser Art von Versuchsdurchführung ebenfalls eine zytoplasmatische Ausrichtung der Schleifendomäne 4 (Daten nicht gezeigt).

Demnach ist festzuhalten, dass durch zwei unabhängige Methoden wie Immunzytochemie und Protease-protection-Assay die von Mochizuki et al. (1996) und der Swissprot-Datenbank postulierte ER-luminale Ausrichtung für die Schleifendomänen 1, 3 und 5 sowie die zytoplasmatische Ausrichtung der Schleifendomänen 2 und 4 bestätigt werden konnte.

3.1.2 Topologische Charakterisierung von Polycystin-2 mittels Histochemie

Um die aus den vorausgegangenen Experimenten gewonnenen Daten weiter zu festigen, wurde entschieden, neben dem immunzytochemischen Assay und dem Protease-Verdau einen weiteren, auf Histochemie beruhenden Ansatz zu verwenden.

Hierzu sollte der Aminosäurebereich 23 bis 510 von humaner, sezernierter, alkalischer Phosphatase (AP) aus Plazenta (oder auch Regan Isozym; siehe auch 2.1.7.B) C-terminal an das HA-Epitop der unter Abbildung 5 dargestellten Konstrukte fusioniert werden. Bei alkalischer Phosphatase handelt es sich um ein membranständiges, glykosyliertes Enzym, das vornehmlich in der Plazenta synthetisiert wird. Der weiter oben angegebene

Aminosäurebereich umfasst dabei den Part für das reife, katalytisch aktive Peptid (AS 23-505), wobei der Abschnitt für das N-terminale Signalpeptid (AS 1-22, wichtig für Sezernierung) jedoch fehlt. Die topologische Charakterisierung der Fusionsproteine sollte dann über den Nachweis der Enzymaktivität erfolgen, die von der jeweiligen subzellulären Lokalisation des Enzymes abhängig ist. Befindet sich das Reporter-Enzym im ER-Lumen bzw. extrazellulär, so ist das Enzym in Folge der Glykosylierung richtig gefaltet und kann das in einem alkalischen Puffer (pH 9,2-9,5) enthaltene NBT und BCIP zu NBT-Formazan und 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-Indigo-Weiß umsetzen, was letztlich durch einen Farbumschlag ins Blau-Rote angezeigt wird (Pierce Biotechnology, Inc., 2005a). Da die alkalische Phosphatase mit ungef. 70 kDa eine im Hinblick auf Translationseffizienz und Proteinstabilität nicht unerhebliche Größenzunahme für die Fusionsproteine darstellt, wurde entschieden, für die Etablierung der Assay-Bedingungen und die ersten Expressionstests das Enzym zunächst nur an PC2 Schleife 1-HA zu fusionieren. Um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein PC2 Schleife 1-HA-AP in voller Länge translatiert wird, wurden COS-7-Zellen mit dem für dieses Protein kodierenden Vektor transient transfiziert, wobei eine Transfektion mit dem sog. Leervektor pcDNA3 als Negativ-Kontrolle diente. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate (40 µg) einer Western-Blot-Analyse mit einem HA-spezifischen Antikörper (12CA5) unterzogen (siehe auch Abb. 22). Da kein Antikörper für das Reporter-Molekül im Labor vorlag, wurde daher zur besseren Größenabschätzung 20 µg Zelllysat aus einer zeitgleich durchgeführten Transfektion von COS-7-Zellen mit dem PC2 fl-HA-Protein (vgl. auch Abb. 5) mit auf das Gel geladen (siehe auch Abb. 22).

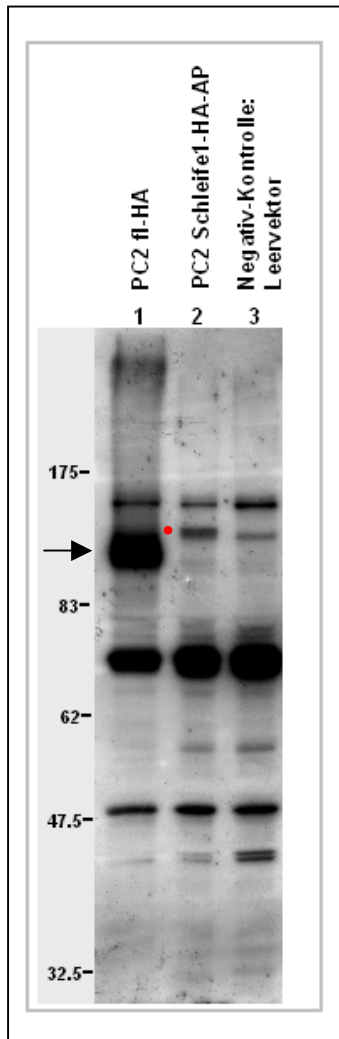


Abb. 22: Expressionstest von PC2 Schleife 1-HA-AP in COS-7-Zellen. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert, wobei die Lysate auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.4.B) geladen wurden, das anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde (2.2.4.D). In Spur 1 sind 20 μg Lysat geladen, wohingegen in Spur 2 und 3 40 μg Lysat geladen wurden. Die PVDF-Membran wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (12CA5; siehe auch 2.1.7.A) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundäntikörpers (vgl. auch 2.1.7.B und 2.2.4.D). Der Pfeil markiert die Laufhöhe für PC2 fl-HA. **PC2 Schleife 1-HA-AP (siehe roter Punkt) wird zwar vollständig, aber nur schwach produziert.**

In Abbildung 22 ist in Spur 2 (siehe auch roter Punkt) eine relativ schwache Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 83 und 175 kDa zu erkennen, die nur knapp über einer ebenfalls in der Negativ-Kontrolle (Abb. 22, Spur 3: Leervektor) zu sehenden Bande verläuft. Im Hinblick auf das ~ 111 kDa (vgl. auch Abb. 5) schwere PC2 fl-HA (Abb. 22, Spur 1, Pfeil) scheint PC2 Schleife 1-HA-AP zwar auf der richtigen Höhe (~ 126 kDa) zu laufen, was eine vollständige Translation des Proteins impliziert, jedoch liegt seine Translationseffizienz weit unter der des Kontrollproteins. Der immunzytochemische Expressionsnachweis zeigte nur wenige PC2 Schleife 1-HA-AP positive Zellen mit einer zytoplasmatischen, perinukleär verstärkten, netzwerkartigen Färbung. Diese war jedoch nur sehr schwach ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Da ein proteolytischer Abbau nach den Blot- und immunzytochemischen Daten zu urteilen nicht der Grund für die schwache Expression zu sein schien, wurde daher versucht, durch Optimierung der Transfektionsbedingungen (z.B. andere Transfektionstechniken, verschiedene DNA-Konzentrationen, andere Zelllinien etc.) die Expressionsraten zu steigern. Jedoch blieben diese Versuche ohne den erwünschten Erfolg

(Daten nicht gezeigt). Da alkalische Phosphatase Farb-Assays an PC2 Schleife 1-HA-AP exprimierenden Nieren-Zellen wie COS-7 und HEK 293T (Mensch), unter Verwendung von Ratten-Nierengefrierschnitten als Positiv-Kontrolle (enthalten endogene alkalische Phosphatase) auch keinen detektierbaren Farbumschlag zeigten, wurde dieser Versuchansatz nicht weiterverfolgt.

3.2 Charakterisierung einer Plasmamembranexport-Signalsequenz für die humane Polycystin-2-Mutante PC2(1/703)

Die subzelluläre Lokalisierung von Polycystin-2 ist ein kontrovers diskutiertes Thema (siehe auch 1.5). So wird in der Insekten-Zelllinie Sf9 und den Nieren-Zelllinien MDCK oder mIMCD3 beispielsweise eine Plasmamembranlokalisation von exogenem bzw. endogenem Polycystin-2 beobachtet (Gonzalez-Perrett et al., 2000; Scheffers et al., 2002; Luo et al., 2003; vgl. auch 1.5). Dem entgegen steht aber die veröffentlichte ER-Lokalisation des heterologen bzw. endogenen Proteins in der HeLa-Karzinom-Zelllinie und den Nieren-Zelllinien HEK 293, COS-7 und LLC-PK₁ (Cai et al., 1999; Koulen et al., 2002; Gallagher et al., 2000; Cedzich, 2000; Hidaka et al., 2004; vgl. auch 1.5). Ein Grund für die widersprüchlichen Befunde könnte dabei in der Wahl der verschiedenen Zelllinien liegen (vgl. auch 1.5). Über die Lokalisation von (endogenem sowie heterologem) Polycystin-2 in der Plasmamembran von primären Zilien bei Nierenepithel-Zellen wie HEK 293, MDCK oder LLC-PK₁ gibt es hingegen keine Zweifel (Cai et al., 1999; Cai et al., 2004; Nauli et al., 2003; Köttgen et al., 2005; Streets et al., 2006; vgl. auch 1.5).

Ein Beitrag zum besseren Verständnis des intrazellulären Transportes von Polycystin-2 wurde durch folgende Befunde geliefert. Biotinylierungs-Assays, Endo H- und PNGase F-Studien zeigten, dass nach Aminosäure 741 bzw. 703 deletierte Formen von PC2 in LLC-PK₁- oder HEK 293-Zellen neben dem ER auch an der Plasmamembran zu detektieren sind (Cai et al., 1999; Cai et al., 2004). Die nach Aminosäure 741 abgeschnittene PC2-Mutante [PC2(1/741)] repräsentiert dabei eine im humanen System vorkommende Nonsense-Mutation (Mochizuki et al., 1996; Magistroni et al., 2003). Für die nach Aminosäure 703 deletierte PC2-Form [PC2(1/703)] konnte gezeigt werden, dass diese in transgenen Ratten für einen Phänotyp vergleichbar dem der polyzystischen Nierenerkrankung im Menschen verantwortlich ist (Gallagher et al., 2006). Bei diesem Tiermodell ist dabei ebenfalls ein Unterschied in der subzellulären Lokalisation des Wildtyp-Proteins und der Deletionsmutante zu beobachten. So ist das mutierte Protein in den Zystenwandepithelzellen vornehmlich am Bürstensaum zu

detektieren, während das endogene Wildtyp-Protein eher in einem basalen Kompartiment lokalisiert zu sein scheint, was dem Befund für das Wildtyp-Protein in den gesunden Kontrolltieren entspricht (Gallagher et al., 2006). Als Grund für die unterschiedliche Lokalisation des Wildtyp-Proteins und der beiden Deletionsmutanten wird das Fehlen einer von AS 787-820 reichenden, C-terminalen Sequenz verantwortlich gemacht, die als ER-Retentionssignal fungieren soll (Cai et al., 1999). Trotz der für das Wildtyp-Protein in manchen Nierenepithelzellen bzw. in (adultem) Nierengewebe nachgewiesenen ER-Retention (Cai et al., 1999; Hidaka et al., 2004; Gallagher et al., 2006; vgl. auch 1.5) konnte dieses im Zellkultursystem wie seine beiden verkürzten Mutationsformen in der Plasmamembran von primären Zilien nachgewiesen werden (Cai et al., 1999; Cai et al., 2004; Hidaka et al., 2004; Geng et al., 2006; vgl. 1.5 und siehe weiter oben). Dieser Aspekt konnte in dem vorgestellten Rattenmodell reproduziert werden (Gallagher et al., 2006). Die Zilien-Lokalisation aller 3 vorgestellten Proteine ist auf ein sog. RVxP-Motif in den ersten 15 N-terminalen Aminosäuren von Polycystin-2 zurückzuführen (Geng et al., 2006). Die weiter oben vorgestellten Daten über die ER-Lokalisation von Wildtyp-Polycystin-2, die Plasmamembrantranslokation der nach Aminosäure 703 deletierten Mutante und die Zilien-Lokalisation beider Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Überexpression der beiden Proteine in COS-7- und LLC-PK₁-Nieren-Zellen bestätigt werden (siehe auch 3.1.1.A bzw. 3.2.3.A und B und Cedzich, 2000).

Daher stellte sich die Frage, wie die Zelle es bewerkstelligt, dass die Lokalisation des Volllängenprotein im Gegensatz zu der nach Aminosäure 703 deletierten Mutante auf die ziliäre Plasmamembran beschränkt bleibt und nicht wie letztere in die nicht ziliäre (= somatische) Plasmamembran gelangen kann. Geng et al. (2006) vermuten, dass ein weiteres Sequenzelement in Polycystin-2 für den unterschiedlichen Transport des Wildtyp-Proteins und seiner Deletionsmutante steuert. So wird postuliert, dass ein restriktiv wirkendes Motiv im C-Terminus von Polycystin-2 dafür verantwortlich ist, dass Polycystin-2 nach der Integration in die ziliäre Plasmamembran im Gegensatz zu PC2(1/703) am Austritt aus selbiger gehindert wird. Diese Theorie ist jedoch eher unwahrscheinlich, da PC2(1/703) auch in der Plasmamembran von LLC-PK₁-Zellen zu finden ist, bevor Zilien ausgebildet wurden (Cai et al., 1999; Koulen et al., 2002). Den Daten aus den Topologie-Studien nach zu urteilen ist es wahrscheinlicher, dass es sich bei der gesuchten Sequenz um ein permissiv wirkendes Motiv außerhalb des C-Terminus handeln muss. So zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass Proteine, die in den Schleifendomänen 1-3 abgeschnitten waren, im ER zurückgehalten

wurden und nur Proteine zur Plasmamembran geleitet wurden, die in Schleifendomäne 4 bzw. 5 deletiert waren (vgl. 3.1.1.A). Aufgrund des fehlenden C-Terminus und des darin enthaltenen ER-Retentionssignals (Cai et al., 1999) wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass sämtliche Schleifen-Konstrukte in die Plasmamembran eingebaut werden. Anhand der übereinstimmenden Aussagen von immunzytochemischen Assays und Protease-Assays konnte ausgeschlossen werden, dass durch die C-terminalen Deletionen bedingte Fehlfaltungen der Schleifenmutanten die Ursache für die subzellulären Lokalisationsunterschiede darstellen (vgl. 3.1.1). Weiterhin schieden Expressionsunterschiede zwischen den fünf Proteinen als Grund aus (vgl. 3.1.1.A). Im Hinblick auf die Aussagen von Geng et al. (2006) lag demnach die Hypothese nahe, dass bei der nach Aminosäure 703 deletierten Variante von Polycystin-2 ein Sequenz-Motiv zwischen Aminosäure 547 und 582 Bedeutung erlangt, das der Deletionsmutante den Transport zur Plasmamembran ermöglicht und im Volllängenprotein entweder maskiert ist oder durch das publizierte Retentionssignal unterdrückt wird.

Um den genannten Kandidatenbereich (AS 547-582) weiter eingrenzen zu können, war die Verwendung von Deletionsmutanten vorgesehen, wobei die eingehendere Charakterisierung der Signalsequenz mit Hilfe von Alanin-Mutagenesestudien an der nach Aminosäure 703 abgeschnittenen Mutante von Polycystin-2 geplant war. Zilienlokalisationsstudien für die Alanin-Mutanten sollten dabei unterstützt durch Zilienlokalisationsstudien für das Wildtyp-Protein und seiner nach AS 703 deletierten Mutante unter dem Einfluss von Transport inhibierenden Agenzien dazu beitragen, den intrazellulären Transport von PC2 und seiner genannten Deletionsmutante aufzuklären.

3.2.1 Bestätigung von AS-Bereich 547-582 als Kandidatenregion

Da die im Verlauf der Topologie-Studien dokumentierten subzellulären Lokalisationsunterschiede der fünf Schleifen-Proteine nicht auf unterschiedliche Translationseffizienzen bzw. Fehlfaltungen zurückzuführen waren (siehe auch 3.1.1.A), kam als mögliche Erklärung demnach nur die Existenz eines spezifischen Plasmamembran-Exportmotivs zwischen AS 547 (Ende von PC2 Schleife 3-HA) und 582 (Ende von PC2 Schleife 4-HA) in Frage. Ein weiteres, immunzytochemisches Experiment sollte noch einmal bestätigen, dass die Abwesenheit bzw. Präsenz des genannten Bereichs die Ursache für die Retention von PC2 Schleife 3-HA im ER und die Translokation von PC2 Schleife 4-HA an

die Plasmamembran darstellt. Hierzu wurden COS-7-Nieren-Zellen mit einem für das Plasmamembranprotein CD8 kodierenden Vektor und einem für die Proteine PC2 Schleife 3-HA oder PC2 Schleife 4-HA kodierenden Plasmid transient kotransfiziert. Ein Vergleich der Färbemuster der verkürzten PC2-Proteine mit dem Färbemuster von CD8 sollte zeigen, ob PC2 Schleife 3-HA im ER zurückgehalten wird bzw. ob PC2 Schleife 4-HA zur Plasmamembran transloziert wird. Achtundvierzig Stunden nach der Kotransfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem gegen das CD8-Protein gerichteten Antikörper (aus Maus) bzw. einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (aus Kaninchen) inkubiert. Der anti-CD8-Antikörper wurde dabei durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper und der anti-HA-Antikörper durch einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 23 dokumentiert.

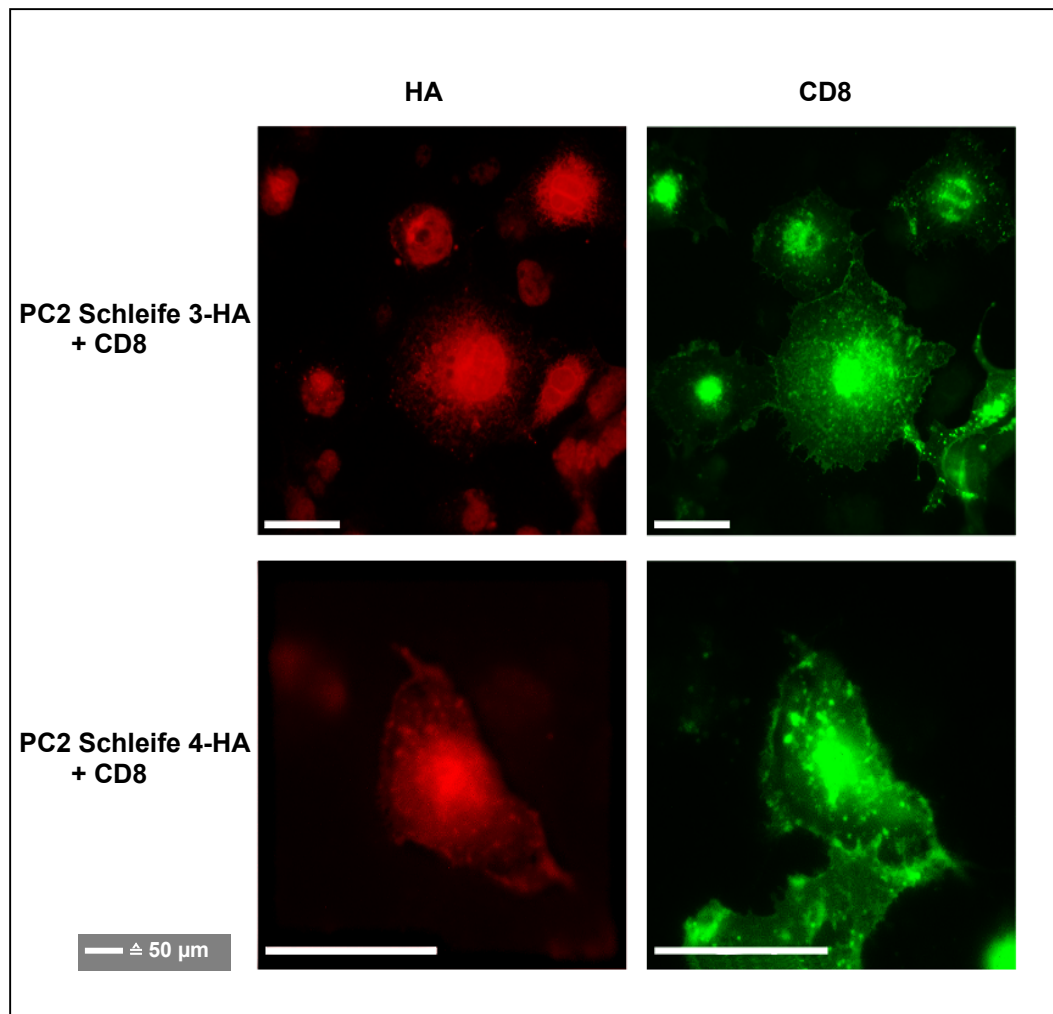


Abb. 23: Koexpression des Plasmamembranmarkers CD8 mit PC2 Schleife 3- bzw. 4-HA in COS-7-Zellen. Transient kotransfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in PFA fixiert und mit Triton X-100 (0,25%) permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern. **Linke Spalte:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (anti-HA; s. auch 2.1.7.A.); die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B.). **Rechte Spalte:** Gegen

CD8 gerichteter Antikörper (OKT 8, s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B.). Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit DMC 2-Kamera photographiert (x40). **Die Färbemuster für CD8 und PC2 Schleife 4-HA sind vergleichbar, wohingegen bei den Färbemustern von PC2 Schleife 3-HA und CD8 deutliche Unterschiede zu sehen sind.**

Der Vergleich der Antikörper-Färbungen für PC2 Schleife 4-HA und CD8 zeigt, dass beide Proteine zur Plasmamembran transportiert werden (vgl. Abb. 23), da in beiden Fällen deutlich die Zellgrenzen bzw. Zellränder der doppelt transfizierten Zelle zu erkennen sind (vgl. auch Abb. 7b, HA). Die Färbungen stimmen jedoch nicht zu 100% überein, was beweist, dass bei den Bildaufnahmen keiner der beiden Farbkanäle in den jeweils anderen „durchgeschlagen“ hat. Möglicherweise bedingt durch die Koexpression von zwei Proteinen verbleibt jedoch relativ viel CD8, aber auch PC2 Schleife 4-HA intrazellulär (vgl. Abb. 23). Im Falle von PC2 Schleife 3-HA verbleibt hingegen alles Protein intrazellulär. Man erkennt ein zytoplasmatisches, perinukleär verstärktes, netzwerkartiges Färbemuster, das in starkem Kontrast zu den deutlich auszumachenden Zellgrenzen und filigranen Zellausläufern der Antikörperfärbung gegen CD8 steht (vgl. Abb. 23). Dies spricht für eine vornehmliche Lokalisierung des PC2 Schleife 3-HA-Proteins im ER (vgl. auch Abb. 7a, HA). Somit konnten die im Verlauf der Topologie-Studien gewonnen Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation von PC2 Schleife 3- und 4-HA noch einmal bekräftigt werden, was unterstreicht, dass die Aminosäuren 547 bis 582 ein Plasmamembran-spezifisches Exportmotiv enthalten könnten.

3.2.2 Eingrenzen des Exportmotivs auf 6 Aminosäuren im Bereich 572-577

Nachdem nun der in Frage kommende Aminosäurebereich N-terminal durch AS 547 und C-terminal durch AS 582 festgelegt wurde (siehe auch Abb. 24 und 3.1.1.A), sollte mit der systematischen Eingrenzung von beiden Seiten begonnen werden.

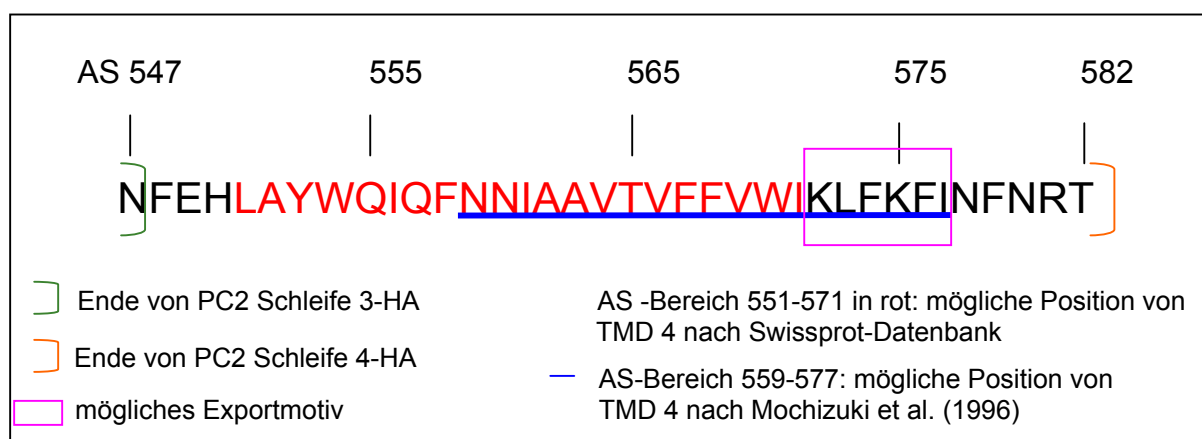


Abb. 24: Kandidatenregion für das Exportmotiv (AS 547-582) von humanem Polycystin-2.

Hierzu wurden Konstrukte hergestellt, die für humanes Polycystin-2 bis Aminosäure 561 [PC2(1/561)], 574 [PC2(1/574)], 578 [PC2(1/578)] und 582 [PC2(1/582)] kodieren (siehe auch 2.1.8.A). Anschließend wurden COS-7-Nieren-Zellen mit den 4 Konstrukten transient transfiziert. Um zu sehen, welche der verkürzten Proteine noch im Stande waren, die Plasmamembran zu erreichen, wurde ein immunzytochemischer Ansatz gewählt, bei dem ein gegen den ersten Schleifenbereich (AS 331-343) gerichteter Antikörper (Mu 50; vgl. auch 2.1.7.A) zum Einsatz kam. Mit Hilfe dieses Antikörpers sollten folglich nur diejenigen Mutanten bei unpermeabilisierten Zellen zu detektieren sein, die zur Plasmamembran transloziert wurden. Es zeigte sich, dass alle Konstrukte exprimiert wurden. Die nach Aminosäure 561 bzw. 574 deletierten Proteine wurden im ER zurückgehalten, wohingegen die nach Aminosäure 578 bzw. 582 trunkeierten Mutanten zur Plasmamembran transportiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, dass der Übergangsbereich zwischen Transmembrandomäne 4 und Schleifendomäne 4 (vgl. Abb. 24) die mögliche Kandidatenregion für das Exportmotiv repräsentiert.

Um eine weitere Eingrenzung vorzunehmen, wurden daher Deletionskonstrukte hergestellt, die für den Bereich bis Position 577 [PC2(1/577)HA], 576 [PC2(1/576)HA], 575 [PC2(1/575)HA], 574 [PC2(1/574)HA] und 573 [PC2(1/573)HA] kodieren. Die Deletionsmutanten wurden C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert, um mittels immunzytochemischer Topologie-Studien (vgl. auch 3.1.1.A) sicherstellen zu können, dass die subzellulären Unterschiede nicht durch die Fehlfaltung einzelner Proteine hervorgerufen wurden. Um nun zu überprüfen, welche der fünf HA-markierten Mutanten noch im Stande waren, an die Plasmamembran zu gelangen, wurden COS-7-Zellen mit den zugehörigen Konstrukten transient transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde ein immunzytochemischer Assay durchgeführt, bei dem unpermeabilisierte sowie permeabilisierte Zellen eines Transfektionansatzes mit einem gegen den ersten Schleifenbereich (AS 331-343) von Polycystin-2 gerichteten Antikörper (Mu 50; siehe auch 2.1.7.A) inkubiert wurden (vgl. Abb. 25). Als Permeabilisierungskontrolle diente dabei eine gegen acetyliertes Tubulin gerichtete Antikörper-Färbung. Im unpermeabilisierten Zustand war kein Signal für acetyliertes Tubulin zu sehen (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden kann, dass mit dem Mu 50-Antikörper nur die Mutanten bei unpermeabilisierten Zellen erfasst wurden, die tatsächlich zur Plasmamembran transportiert wurden. Die Ergebnisse dieses Versuchs werden exemplarisch an den Mutanten PC2(1/576)HA und PC2(1/573)HA gezeigt (vgl. Abb. 25).

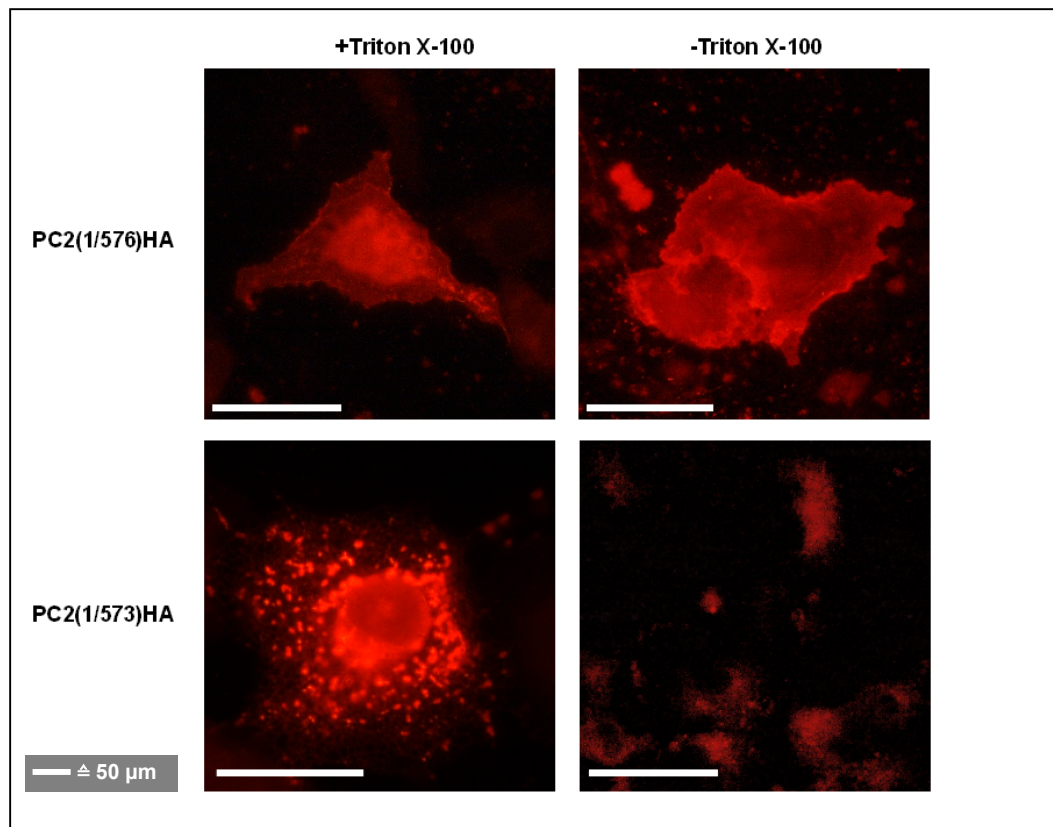


Abb. 25: Überprüfung der subzellulären Lokalisierung von PC2(1/576)HA und PC2(1/573)HA in COS-7-Zellen mittels Mu 50-Antikörper-Nachweis. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in PFA fixiert. Ein Teil der Zellen wurde durch Behandlung mit 1x PBS im unpermeabilisierten Zustand (-Triton X-100) belassen, der andere Teil wurde mit 0,25% Triton X-100 permeabilisiert (+Triton X-100). Danach erfolgte die Inkubation mit einem gegen die Schleifendomäne 1 von Polycystin-2 gerichteten Antikörper (Mu 50; s. auch 2.1.7.A). Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B). Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 mit DMC 2-Kamera photographiert (x40), wobei für die unpermeabilisierten bzw. permeabilisierten Zellen identische Belichtungszeiten und Belichtungsstärken verwendet wurden. **PC2(1/576)HA gelangt zur Plasmamembran, wohingegen PC2(1/573)HA intrazellulär verbleibt.**

Aus Abbildung 25 wird ersichtlich, dass PC2(1/576)HA noch zur Plasmamembran transportiert wird, wohingegen PC2(1/573)HA intrazellulär verbleibt. Die Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der beiden Mutanten kommen auch darin zum Ausdruck, dass bei dem translokationsdefizienten Protein ein zytoplasmatisches, perinukleär verstärktes, netzwerkartiges Färbemuster zu erkennen ist, bei dem keinerlei Zellgrenzen auszumachen sind (vgl. Abb. 25). Dies deutet eine ER-Lokalisation des Proteins an. Die Herkunft der vesikelartigen Strukturen, die sich über die gesamte Zelle verteilen und um den Kern herum verdichten, ist allerdings unklar. Da solche Strukturen auch z.T. bei einer transienten Überexpression des Volllängenproteins beobachtet wurden, kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Artefakt infolge der Expression einer Mutante von Polycystin-2 handelt. Die Antikörper-Färbung für PC2(1/576)HA lässt hingegen deutliche Zellränder bzw. Zellgrenzen erkennen, was unterstreicht, dass dieses Protein zur Plasmamembran transportiert

wird. Die starke perinukleäre Färbung von mit Triton X-100 permeabilisierten Zellen deutet jedoch an, dass trotz der Plasmamembranlokalisierung von PC2(1/576)HA relativ viel Protein intrazellulär zu verbleiben scheint (vgl. Abb. 25). Ein Vergleich der Anzahl von gefärbten Zellen pro Blickfeld bei unpermeabilisierten und permeabilisierten Zellen zeigte bei der Mutante PC2(1/577)HA noch keinen Unterschied (es wurden mind. 200 Zellen in der Hoechst-Färbung ausgezählt; siehe auch 2.2.2.K). Bei PC2(1/576)HA (vgl. auch Abb. 25) war mit ungef. 20% Differenz bereits ein Ungleichgewicht zugunsten der Zahl von gefärbten, permeabilisierten Zellen zu beobachten. Im Falle der nach Aminosäure 575 abgeschnittenen Mutante PC2(1/575)HA waren bei unpermeabilisierten Zellen mehr als 50% weniger gefärbte Zellen als bei den permeabilisierten Zellen zu zählen. Die beiden nach Aminosäure 574 [PC2(1/574)HA] bzw. 573 [PC2(1/573)HA] abgeschnittenen Mutanten wurden nicht mehr zur Plasmamembran transportiert und waren demzufolge nur noch in permeabilisierten Zellen zu detektieren (vgl. auch Abb. 25).

Um auszuschließen, dass Topologieunterschiede den Grund für die subzellulären Unterschiede bilden, wurden im Anschluss mit allen fünf Deletionsmutanten immunzytochemische Topologie-Studien nach dem unter Abbildung 8 dargestellten Permeabilisierungsprinzip durchgeführt. Diese Studien ergaben, dass bei allen fünf Proteinen das HA-Epitop erst nach Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin zu detektieren war, was genau dem mit diesem Versuchsansatz erhaltenen Befund für PC2 Schleife 4-HA (zytoplasmatisch ausgerichtet; vgl. auch 3.1.1.A und B) entspricht. Daher kann für die Aminosäuren 573-577 eine zytoplasmatische Exponierung angenommen werden, wie sie von der Swissprot-Datenbank postuliert wird (vgl. auch Abb. 24). Die Topologie-Daten implizieren daher, dass die unterschiedliche Lokalisation der Deletionsmutanten nicht durch die Fehlfaltung einzelner Proteine bedingt ist.

571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	Proteinnamen
I	K	L	F	K	F	I	N	F	N	WT-PC2
I	K	L	F	K	F	I	Y	L	S	PC2(1/577)HA
I	K	L	F	K	F	Y	L	S	Y	PC2(1/576)HA
I	K	L	F	K	Y	L	S	Y	P	PC2(1/575)HA
I	K	L	F	Y	L	S	Y	P	Y	PC2(1/574)HA
I	K	L	Y	L	S	Y	P	Y	D	PC2(1/573)HA

Abb. 26: Aminosäuresequenzen der HA-markierten Deletionsmutanten. Buchstaben in rot: angehängtes HA-Epitop; Zahlenangaben (oberste Reihe) entsprechen den Aminosäurepositionen in humanem Polycystin-2.

Man kann die Daten zusammenfassend so interpretieren, dass dem Bereich zwischen Aminosäure 575 und 577 eine wichtige Rolle für den Export zur Plasmamembran zukommt, da eine schrittweise Deletion der Aminosäuren aus diesem Bereich zur stufenweisen Abnahme bzw. kompletten Unterdrückung des Plasmamembrantransportes der PC2-Mutanten führt, womit die Daten aus den Experimenten mit den HA-freien Deletionsmutanten bestätigt wären. Den immunzytochemischen Daten und dem Schaubild in Abbildung 26 nach zu urteilen scheint die hydrophobe Aminosäure Isoleucin (577) eine Rolle in der Signalsequenz innezuhaben, da ihr Ersatz durch das polare, aromatische Tyrosin (stammt vom HA-Epitop) zu Einbußen des Transportes zur Plasmamembran führt. Eine genaue Analyse der Bedeutung der weiteren Aminosäuren des untersuchten Bereiches am Exportmotiv wäre zu diesem Zeitpunkt allerdings reine Spekulation, da ein Blick auf Abbildung 26 zeigt, dass die infolge der Deletionen mannigfaltigen Aminosäure-Austausche der Wildtyp-Aminosäuren mit solchen des HA-Epitops eine Interpretation der Funktion der einzelnen Aminosäuren unmöglich macht.

3.2.3 Charakterisierung des Aminosäurebereiches 572-577 durch Alanin-Mutagenese und Zilienlokalisationsstudien

Die Deletionsmutanten- und Topologie-Studien weisen den Bereich C-terminal von Aminosäure 571 bis 577 als mögliche Kandidatenregion für ein Exportmotiv aus (vgl. auch Abb. 24), wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht eventuell noch weitere N-terminal von Aminosäure 572 befindliche Aminosäuren zu dem Motiv gehören. Daher wurde beschlossen, den nach Swissprot-Datenbankangaben als zytoplasmatisch deklarierten Aminosäurebereich 572-577 einer sog. Alanin-Mutagenese zu unterziehen. Diese auch als Alanin-Scanning-Mutagenese bezeichnete Methode wird häufig zur näheren Charakterisierung von Signal-Motiven bei Proteinen eingesetzt (Nufer et al., 2003; Yan et al., 2004). Der Einsatz dieser Technik sollte Klarheit darüber verschaffen, ob ausschließlich der Bereich von Aminosäure 572 bis 577 notwendig ist, die Translokation einer (plasmamembranständigen) C-terminalen Deletionsmutante von PC2 [PC2(1/703)] zur Plasmamembran zu ermöglichen.

A. Alanin-Mutagenese-Studien für den Aminosäurebereich 572-577 in PC2(1/703)HA

Da also die Deletionsmutanten (siehe auch 3.2.2) nur Informationen über die C-terminale Begrenzung der Kandidatenregion liefern konnten, wurde entschieden, mit einer C-terminal HA-markierten, nach Aminosäure 703 deletierten Mutationsform von humanem Polycystin-2 [PC2(1/703)HA] weiterzuarbeiten (siehe auch 3.2). Diese Mutante ist in COS-7- und LLC-PK₁-Nieren-Zellen nicht nur wie das Wildtyp-Protein im ER, sondern auch an der Plasmamembran zu detektieren (Cai et al. 1999; Cedzich, 2000; siehe auch Abb. 27a und b). Durch die gezielte Mutagenese (2.2.3.M) des Aminosäurebereiches 572-574 [PC2(1/703)HA KLF->AAA] bzw. 575-577 [PC2(1/703)HA KFI->AAA] von PC2(1/703)HA in Alanin-Reste sollte im folgenden untersucht werden, ob die Plasmamembrantranslokation des Proteins vollständig unterbunden werden kann. Hierzu wurden COS-7- und LLC-PK₁-Zellen mit den Konstrukten für die HA-markierten Alanin-Mutanten transient transfiziert, wobei zeitgleich noch die Vektoren für die HA-markierte PC2(1/703)-Mutante und das HA-markierte Wildtyp-PC2-Protein als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle im Hinblick auf die Plasmamembranlokalisation mittransfiziert wurden. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde dann ein sog. Biotinylierungs-Assay (siehe auch 2.2.2.J) mit einem Sulfo-NHS-SS-Biotin-Reagenz durchgeführt.

Bei diesem Assay wird das Reagenz nach Abnahme des Kulturmediums auf die Zellen gegeben, wo es über einen sog. nukleophilen Angriff mit Lysin- oder Arginin-Resten in extrazellulären Domänen von plasmamembranständigen Proteinen reagieren kann (Pierce Chemical Company, 2001). Die Sulfonat-Gruppe (-SO₃) am *N*-hydroxysuccinimid-Ring ist für die Wasserlöslichkeit des Reagenz und dessen damit verbundene Unfähigkeit, die Plasmamembran zu durchdringen, verantwortlich (Pierce Biotechnology, Inc., 2005b). Nach dem Abbrechen der Reaktion mit einem Glycin-haltigen Puffer wurden die Zellen lysiert und die Lysate einer Präzipitation mit Streptavidin-Beads unterzogen, wobei natürlich nur diejenigen Proteine mit den Beads interagieren sollten, die zur Plasmamembran transportiert wurden. Um daher sicherzustellen, dass das Wildtyp-Protein und die untersuchten Mutanten nicht unspezifisch mit den Beads interagieren, wurden immer Zellen des gleichen Transfektionsansatzes in Biotin-freiem Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Lysate (L), die Überstände (Ü) nach der Präzipitierung sowie die Beads (B) einer Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 27a und b). Im Falle von Teilabbildung 27a wurde die PVDF-Membran mit einem anti-HA-Antikörper (3F10, aus Ratte) inkubiert und bei Teilabbildung 27b wurde ein

gegen den N-Terminus (AS 103-203) von Polycystin-2 gerichteter Antikörper (YCB9, aus Kaninchen) eingesetzt. Um eine Ladungs- und Biotinylierungs-Kontrolle zu haben, wurden die Membranen anschließend mit einem gegen das Plasmamembranprotein Na^+/K^+ -ATPase (α 1-Untereinheit) gerichteten Antikörper aus Maus inkubiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 27a und b zu sehen. Die Versuche mit den entsprechenden Biotin-freien Proben ergaben keinerlei unspezifische Interaktionen der untersuchten Proteine mit den Streptavidin-Beads und sind daher nicht aufgeführt.

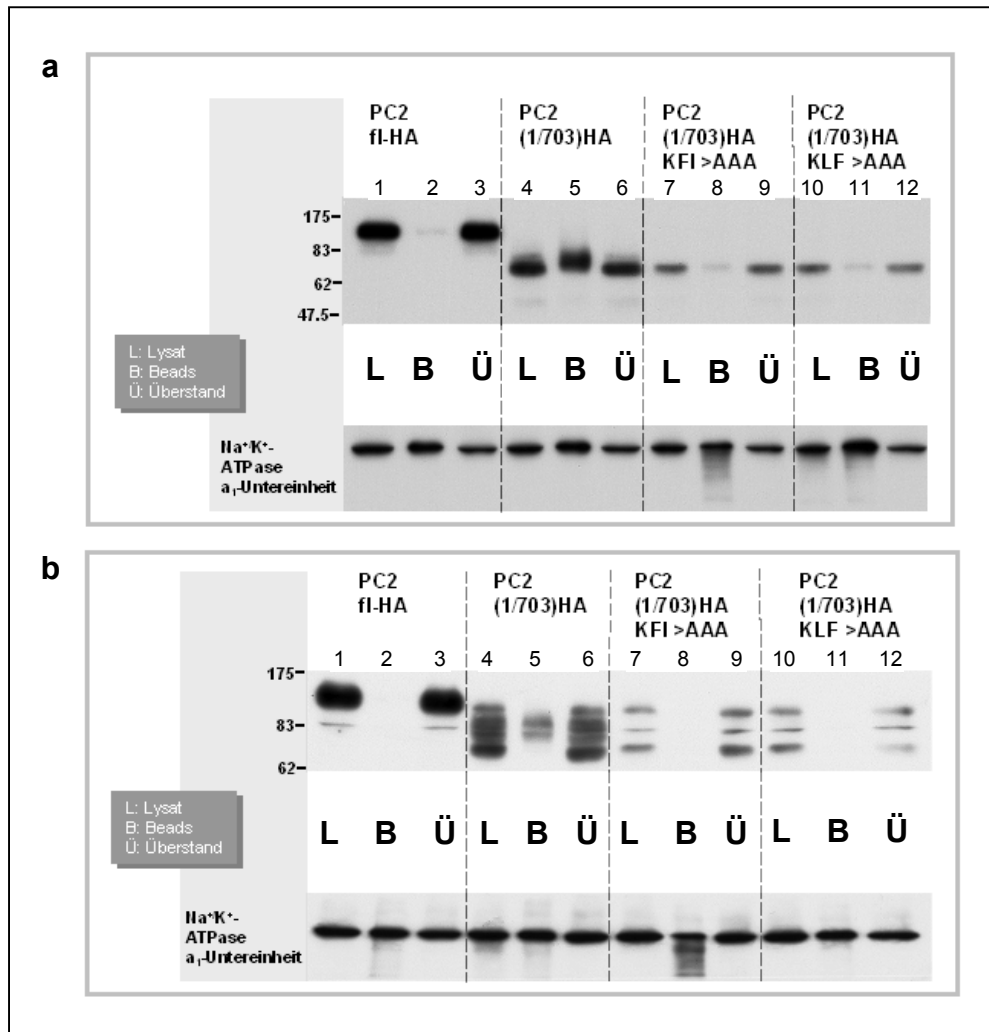


Abb. 27: Biotinylierungs-Assay für Tripel-Alanin-Mutanten von PC2(1/703)HA in COS-7- und LLC-PK₁-Zellen. Transient transfizierte COS-7 (a)- und LLC-PK₁ (b)-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion einem Biotinylierungs-Assay (s. auch 2.2.2.J) unterzogen, lysiert und die Lysate (130 μ g) mit Streptavidin-Beads präzipitiert. Die Beads wurden in 30 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei 15 μ l (B) auf 10%ige SDS-Gele geladen wurden. Weiterhin wurden jeweils identische Mengen (10 μ g) der Lysate (L) und der Überstände (Ü) auf die Gele aufgetragen. Die Gele wurden anschließend auf PVDF-Membranen transferiert (s. auch 2.2.4.D), die mit folgenden Primärantikörpern inkubiert wurden. **a oberer Blot:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (3F10; s. auch 2.1.7.A); **unterer Blot:** Reinkubation der Membran mit einem gegen die Na^+/K^+ -ATPase (α 1-Untereinheit) gerichteten Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). **b oberer Blot:** gegen den N-Terminus von humanem Polycystin-2 gerichteter Antikörper (YCB9; siehe auch 2.1.7.A); **unterer Blot:** Siehe a unterer Blot. Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (2.1.7.B). **Die Alanin-Mutagenese des Aminosäurebereiches 572-574 und 575-577 bei PC2(1/703)HA inhibiert dessen Translokation zur Plasmamembran.**

Entsprechend der publizierten Plasmamembranlokalisation von PC2(1/703)HA [\sim 81 kDa] (Cai et al., 1999) ist dieses biotinyliert und über Streptavidin-Beads präzipitiert worden (vgl. Abb. 27a und b, Spur 5). Die Tatsache, dass sowohl in COS-7-Zellen als auch in LLC-PK₁-Zellen nicht der gesamte Plasmamembran-Anteil der PC2(1/703)-Mutante und des Kontrollproteins (Na⁺/K⁺-ATPase) mit den Streptavidin-Beads präzipitiert werden konnte (siehe jeweils Bead-Spur in Abb. 27a und b), ist dadurch zu erklären, dass die Biotinylierung möglicherweise basolaterale Plasmamembranbereiche aufgrund der Zell-Zell-Kontakte nicht bzw. kaum erfaßt und andererseits natürlich auch andere Plasmamembranproteine biotinyliert werden, die Bindeplätze an den Beads beanspruchen. Betrachtet man das Volllängenprotein [\sim 111 kDa] in den Abbildungen 27a und b in Spur 2, so ist festzuhalten, dass dieses entsprechend seiner ER-Lokalisation (Cai et al., 1999) nicht in der Bead-Spur zu detektieren ist. Genau wie das Wildtyp-Protein sind auch die beiden Alanin-Mutanten [\sim 81 kDa] bei keiner der beiden Zelllinien in den Spuren der mit SDS-Probenpuffer behandelten Beads zu sehen (vgl. Abb. 27a und b, Spur 8 und 11). Die im Fall des COS-7-Zellexperimentes (Abb. 27a) schwach erkennbaren Banden in den Beadspuren (vgl. Abb. 27a Spur 2, 8 und 11) des Volllängenproteins und der Alanin-Mutanten resultieren anscheinend aus der schwachen Biotinylierung intrazellulärer Proteine, da ein „Reblot“ der Membran geringe Mengen des ER-luminalen Chaperons Calreticulin in allen vier Bead-Spuren nachwies (Daten nicht gezeigt).

Da trotz der leichten Degradierung der Na⁺/K⁺-ATPase in Spur 8 bei Abbildung 27a und b auch nach längerer Exposition keine Banden für die PC2(1/703)HA KFI->AAA-Mutante (AS 575-577) auftraten, kann man schlussfolgern, dass die Alanin-Mutagenese der Aminosäurebereiche 572-574 (KLF) bzw. 575-577 (KFI) bei PC2(1/703)HA dessen Translokation zur Plasmamembran in COS-7- und LLC-PK₁-Zellen vollständig unterbindet. Um nun zu überprüfen, welche Bedeutung den einzelnen Aminosäuren dieses Aminosäureabschnittes zukommt, wurde entschieden, die Aminosäuren des genannten Bereiches einzeln in Alanine zu überführen. Hierzu wurden mittels Mutagenese-PCR die Aminosäuren 577 [PC2(1/703)HA KFI->KFA], 576 [PC2(1/703)HA KFI->KAI], 575 [PC2(1/703)HA KFI->AFI], 574 [PC2(1/703)HA KLF->KLA], 573 [PC2(1/703)HA KLF->KAF] und 572 [PC2(1/703)HA KLF->ALF] der C-terminal HA-markierten PC2(1/703) Mutante in Alanine überführt. Um die Translokationseffizienz der HA-markierten Mutanten (\sim 81 kDa) zu überprüfen, wurden COS-7-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert, da in dieser Zelllinie im Vergleich zu den LLC-PK₁-Zellen bessere

Expressionsraten erzielt werden konnten. Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen im Hinblick auf Plasmamembranlokalisation wurden zeitgleich die Vektoren für PC2(1/703)HA, PC2 fl-HA, PC2(1/703)HA KFI->AAA (AS 575-577) und PC2(1/703)HA KLF->AAA (AS 572-574) mittransfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde ein Biotinylierungs-Assay nach dem weiter oben (Abb. 27a und b) erläuterten Prinzip durchgeführt. Nach dem Assay wurden die Lysate (L) und die Überstände der mit SDS-Probenpuffer behandelten Beads (B) einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen den N-Terminus (AS 103-203) von Polycystin-2 gerichteten Antikörper (YCB9, aus Kaninchen) unterzogen. Als Ladungs- und Biotinylierungs-Kontrolle wurde wieder das Plasmamembranprotein Na⁺/K⁺-ATPase (α 1-Untereinheit) verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 28a und b zu sehen. Die Versuche mit den entsprechenden Biotin-freien Proben ergaben keinerlei unspezifische Interaktionen der untersuchten Proteine mit den Streptavidin-Beads (Daten nicht gezeigt).

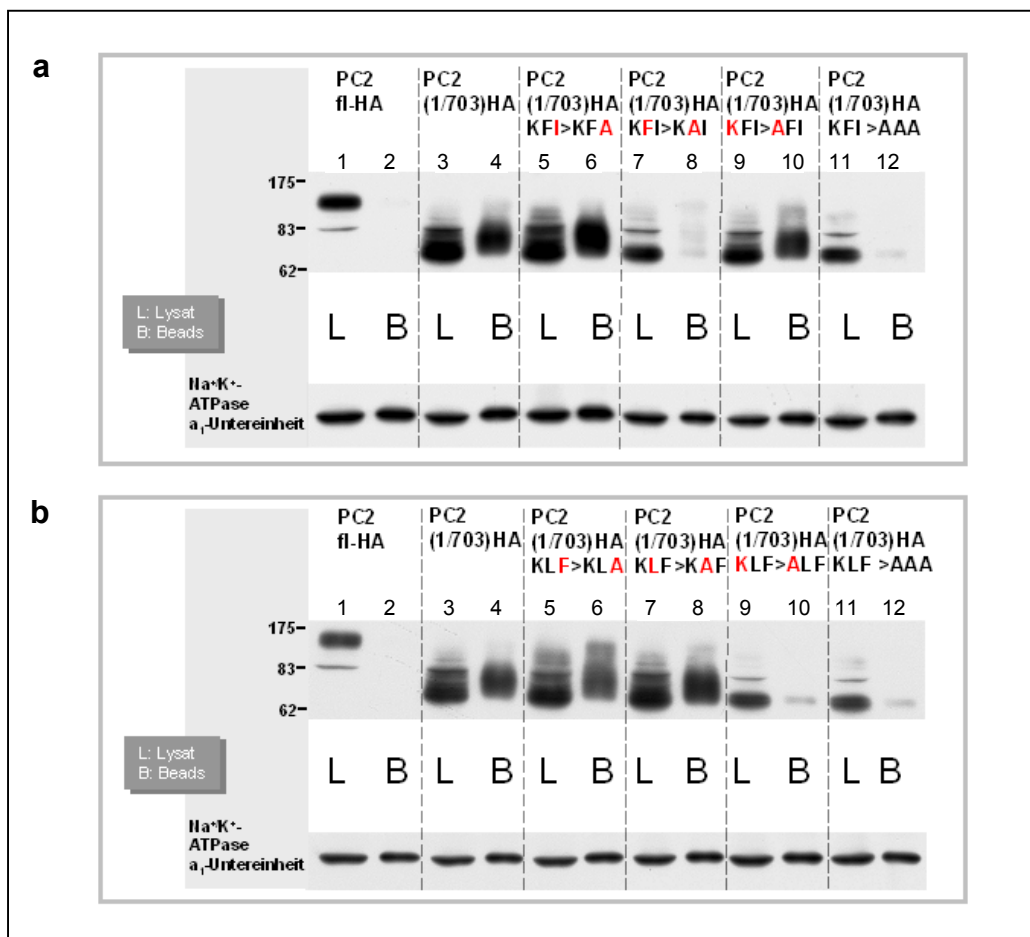


Abb. 28: Biotinylierungs-Assay für die Punktmutanten von PC2(1/703)HA in COS-7-Zellen. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion einem Biotinylierungs-Assay (s. auch 2.2.2.J) unterzogen, lysiert und die Lysate (170 μ g) mit Streptavidin-Beads präzipitiert. Die Beads wurden in 30 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei 15 μ l (B) auf 10%ige SDS-Gele geladen wurden. Weiterhin wurden jeweils identische Mengen (12 μ g) der Lysate (L) auf die Gele aufgetragen. Die Gele wurden anschließend auf PVDF-Membranen transferiert (s. auch 2.2.4.D), die mit folgenden Primärantikörpern inkubiert wurden (gilt für a und b). **Oberer Blot:** Gegen den N-Terminus von Polycystin-2 gerichteter Antikörper (YCB9;

s. auch 2.1.7.A.) **Unterer Blot:** Reinkubation der Membran mit einem gegen Na^+/K^+ -ATPase ($\alpha 1$ -Untereinheit) gerichteten Antikörper (siehe auch 2.1.7.A). Die Banden-Detektion erfolgte durch Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern (2.1.7.B). **Die Aminosäurereste 572 (K) und 576 (F) spielen eine elementare Funktion für den Transport von PC2(1/703)HA zur Plasmamembran.**

Mit den in Abbildung 28a und b gezeigten Kontrollen können die Ergebnisse aus Abbildung 27a bzw. b reproduziert werden. Unter Berücksichtigung der Bandenstärken in Spur 2 und 12 bei beiden Teilabbildungen ist die in der Bead-Spur der PC2(1/703)HA **KLF**->**ALF**-Mutante [AS 572] (vgl. Spur 10 bei Abb. 28b) auftretende Bande wohl auch als „ER-Hintergrunds-Biotinylierung“ zu bezeichnen (vgl. auch Abb. 27a, Spur 2, 8 und 11). Demnach ist festzuhalten, dass ein Austausch des Lysin-Restes an Position 572 durch Alanin den Transport von PC2(1/703)HA an die Plasmamembran komplett unterbinden kann. Mit einer nicht ganz so drastischen, jedoch ebenfalls im Western-Blot gut sichtbaren Reduktion der Exporteffizienz, fällt der Ersatz von Phenylalanin durch Alanin an Position 576 bei PC2(1/703)HA **KFI**->**KAI** aus (vgl. Abb. 28a, Spur 8). Bei allen anderen Mutanten deuteten die Blot-Daten auf keinerlei verminderte Translokationseffizienz hin (vgl. Abb. 28a und b). Zusammenfassend kann demnach ausgesagt werden, dass der Aminosäurebereich 572-577 von PC2(1/703)HA für sich genommen ausreicht, um den Transport von PC2(1/703)HA an die Plasmamembran zu steuern. Bei dem Exportprozess scheinen vor allem der Lysin-Rest an Position 572 und der Phenylalanin-Rest an Position 576 eine maßgebliche Rolle zu spielen. Ein immunzytochemischer Nachweis der Alanin-Mutanten in COS-7- bzw. LLC-PK₁-Zellen korrelierte ebenfalls mit den Biotinylierungs-Daten (Ergebnisse nicht gezeigt). So war lediglich bei PC2(1/703)HA **KLF**->**ALF** (AS 572) und den beiden Tripel-Alanin-Mutanten eine zytoplasmatische, perinukleär verstärkte, netzwerkartige Färbung zu erkennen, was auf eine vornehmliche ER-Lokalisation der Proteine hindeutet (vgl. auch Cai et al., 1999; Cedzich, 2000). Bei den restlichen Mutanten waren entsprechend ihrer Plasmamembranlokalisation Zellen mit deutlich sichtbaren Zellgrenzen zu beobachten.

B. Zilienlokalisationsstudien der Alanin-Mutanten von PC2(1/703)HA

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureabschnitt 572-577 den Transport von PC2(1/703)HA zur Plasmamembran reguliert. Als nächstes sollte daher überprüft werden, ob das 6 Aminosäuren umfassende Motiv den unter 3.2 geforderten spezifischen Transport von PC2(1/703) zur somatischen (= nicht ziliären) Plasmamembran steuert. Da die Sensitivität eines Biotinylierungs- oder Endo H-Assays vermutlich aufgrund der geringen Dimensionen eines Ziliums nicht ausreicht, Proteine wie z.B. Wildtyp-

Polycystin-2, die ausschließlich auf die ziliäre Plasmamembran beschränkt sind, zu detektieren (vgl. auch Geng et al., 2006), wurde entschieden, einen immunzytochemischen Nachweis für die Lokalisation in der ziliären Plasmamembran zu führen. Hierzu wurden LLC-PK₁-Nieren-Zellen mit den Konstrukten für die PC2(1/703)HA-Mutante und für sämtliche der HA-markierten Alanin-Mutanten dieses Proteins transient transfiziert, da LLC-PK₁-Zellen im Vergleich zu COS-7-Zellen im ausdifferenzierten Zustand primäre Zilien ausbilden können. So wurden die transfizierten Zellen erst 4 Tage nach der Transfektion fixiert, um einen möglichst hohen Differenzierungsgrad und damit verbunden eine hohe Ziliendichte zu erreichen (vgl. auch 2.2.2.E). Ein gegen acetyliertes Tubulin (ein Zilien-Marker-Protein) gerichteter Antikörper (aus Maus) wurde zur Zilien-Detektion verwendet und mit einem FITC-gekoppelten Sekundäntikörper nachgewiesen (vgl. Abb. 29a-e). Die Expression der zu untersuchenden Proteine wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (aus Kaninchen) getestet, der mit einem Cy3-gekoppelten Sekundäntikörper identifiziert wurde (vgl. Abb. 29a-e).

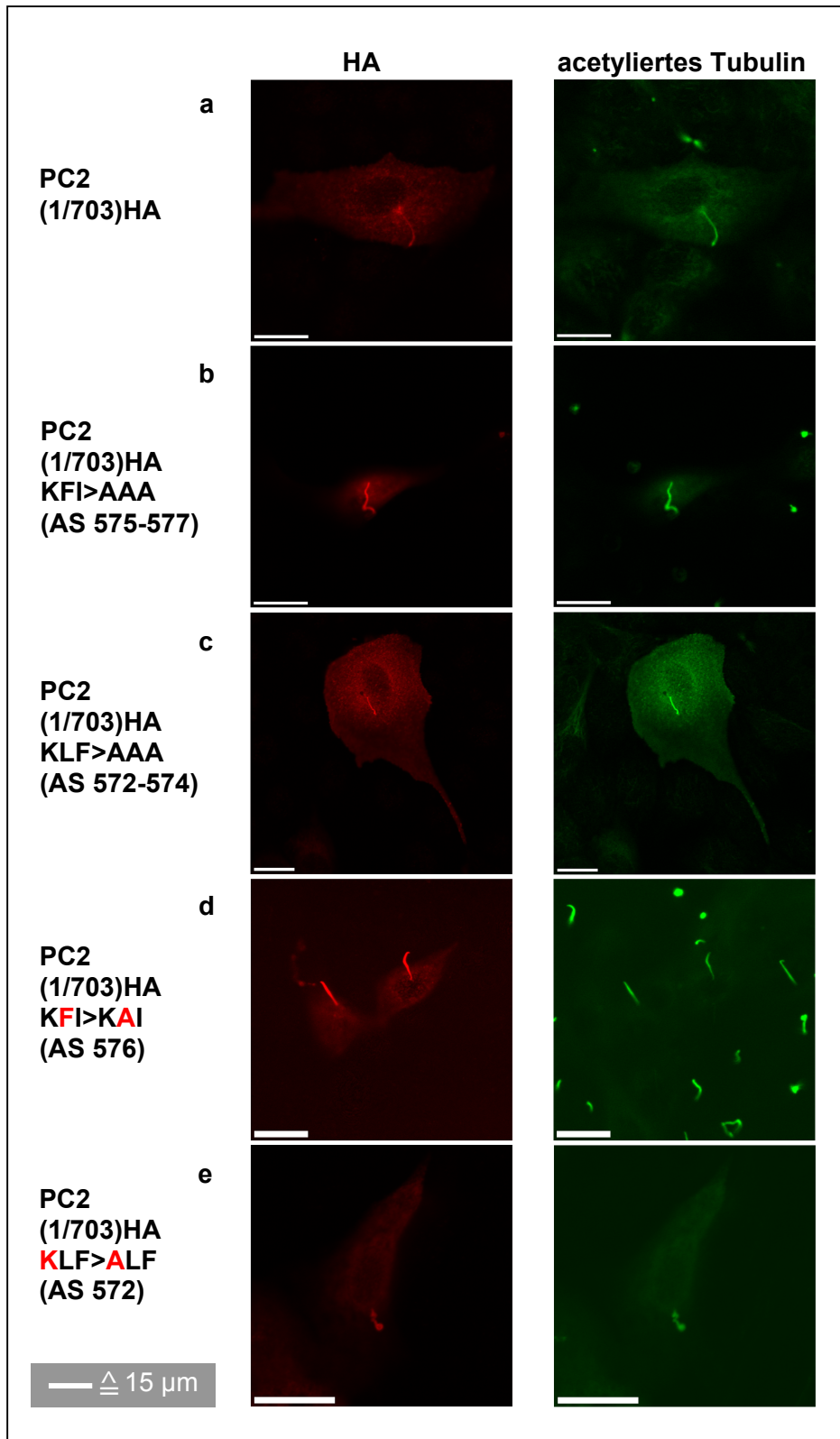


Abb. 29: Zilienlokalisationsstudien für PC2(1/703)HA und seine HA-markierten Alanin-Mutanten. Transient transfizierte LLC-PK₁-Zellen wurden 4 Tage nach der Transfektion mit PFA fixiert und mit Triton X-100 (0,25%) permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den folgenden Primärantikörpern (gilt für a-e). **Linke Spalte:** Gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (anti-HA; s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B). **Rechte Spalte:** Gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (2.1.7.A); die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe auch 2.1.7.B). Die Zellen wurden an einem Zeiss LSM 510 photographiert (x63). **Die Alanin-Mutagenese des Aminosäurebereiches 572-577 bei PC2(1/703)HA hat keinerlei Einfluss auf dessen Lokalisation in der ziliären Plasmamembran.**

In Abbildung 29a-e ist zu erkennen, dass alle vier im Hinblick auf die Translokation zur somatischen Plasmamembran defizienten Alanin-Mutanten von PC2(1/703)HA wie dieses in der Zilienmembran lokalisiert sind. Daneben konnten auch alle anderen Punktmutanten und das Volllängenprotein in der ziliären Plasmamembran nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass also auch diejenigen Proteine die Zilienplasmamembran erreichen, die nicht mehr in der Lage sind, zur somatischen Plasmamembran zu gelangen, beweist, dass das Aminosäure-Motiv 572-577 spezifisch den Transport von PC2(1/703) zur somatischen Plasmamembran reguliert. Somit müssen die Proteine auf direktem Weg und nicht über den Umweg über die somatische Plasmamembran (also über Diffusion) ins Zilium gelangt sein.

3.2.4 Untersuchungen des Transportes von PC2 fl-HA und PC2(1/703)HA zum Zilium

Die Experimente der vorausgegangenen Kapitel zeigen, dass der Aminosäurebereich 572-577 bei PC2(1/703)HA für den spezifischen Transport des Proteins zur somatischen Plasmamembran verantwortlich ist. So beeinflusst die Alanin-Mutagenese einzelner oder mehrerer Aminosäuren dieses Abschnittes in keinsten Weise die Lokalisation der nach Aminosäure 703 deletierten Mutante von Polycystin-2 in der Zilienmembran. Dies impliziert, dass intrazellulär zwei unterschiedliche Transportwege zur somatischen bzw. ziliären Zellmembran existieren.

A. Endoglykosidase H-Studien

Um einen Eindruck über die intrazellulären Transportwege von im Hinblick auf die Translokation zur somatischen Plasmamembran defizienten PC2(1/703)-Mutanten, wie zum Beispiel den Tripel-Alanin-Mutanten, in LLC-PK₁-Zellen zu bekommen, wurde beschlossen, deren Glykosylierungsstatus mittels Endoglykosidase H zu überprüfen. Bei Endoglykosidase H handelt es sich um ein Enzym, das *N*-Glykane vom „Mannose-reichen- und Hybrid-Typ“ durch Hydrolyse der endständigen Chitobiose-Disaccharid-Einheit spaltet (Lottspeich und Zorbas, 1998; Brehm, 2006). Erweist sich ein Protein als sensitiv gegenüber dem Enzym, so bedeutet dies, dass das Protein vom ER maximal bis zum Cis-Golgi-Apparat gelangt sein kann (Rothmann und Fine, 1980). Proteine, die auf ihrem Weg zur Plasmamembran über den Cis-Golgi-Apparat hinaus transportiert werden, erfahren weitere posttranslationale Prozessierungen der angehängten Zuckerreste, die zum Erwerb einer sog. Endo H-Resistenz

führen (Rothman und Fine, 1980). Für die Endoglykosidase H-Studien wurden LLC-PK₁-Nieren-Zellen transient mit den Vektoren für die beiden HA-markierten Tripel-Alanin-Mutanten transfiziert. Als Kontrollen wurden ebenfalls die Vektoren für das HA-markierte Volllängenprotein und die nach Aminosäure 703 deletierte, HA-markierte Mutante mittransfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat in einen Endo H-Assay eingesetzt, wobei die Lysatproben jedes Transfektionsansatzes sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des deglykosylierenden Enzyms inkubiert wurden. Nach der Enzym-Reaktion wurden die Proben einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10) unterzogen (vgl. Abb. 30a und b).

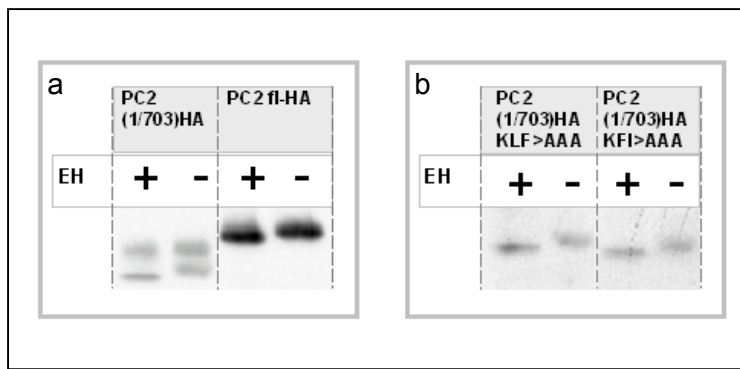


Abb. 30: Endoglykosidase H-Assay für die Tripel-Alanin-Mutanten von PC2(1/703)HA in LLC-PK₁-Zellen. 48 Stunden nach der Transfektion wurden transient transfizierte LLC-PK₁-Zellen lysiert und die Lysate denaturiert. Die Lysate wurden anschließend in An- bzw. Abwesenheit von Endo H (+/- **EH**) inkubiert. Im Falle von PC2 fl-HA wurden 10 µg, im Falle von PC2(1/703)HA 12 µg Lysat eingesetzt. Im Falle der beiden Tripel-Alanin-Mutanten wurden 20 µg Lysat eingesetzt. Nach der Deglykosylierungs-Reaktion wurden die gesamten Reaktionen auf 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele geladen, die auf PVDF-Membranen transferiert wurden (s. auch 2.2.4.D). Die Membranen wurden mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper inkubiert (3F10; s. auch 2.1.7.A). Die Banden-Detektion erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. **Die Tripel-Alanin-Mutanten von PC2(1/703)HA erweisen sich als komplett sensitiv gegenüber Endoglykosidase H.**

Abbildung 30a und b zeigen, dass sich die beiden Alanin-Mutanten sowie das Volllängenprotein als komplett sensitiv gegenüber dem Enzym erweisen (vgl. auch Cai et al., 1999; Cedzich, 2000). Biochemisch gesehen bedeutet dies, dass die Proteine vornehmlich im ER sitzen bzw. maximal bis zum Cis-Golgi-Apparat gelangt sein können (Rothman und Fine, 1980), ein Befund, der mit den Biotinylierungsbefunden (3.2) korreliert. Entsprechend den Biotinylierungs-Daten ist demnach nur im Falle der nach Aminosäure 703 deletierten Polycystin-2-Mutante neben einer Endo H-sensitiven Fraktion auch eine Endo H-resistente Fraktion zu erkennen (vgl. auch Cai et al., 1999), die in Form eines „Bandenschmiers“ über der prominenten, Endo H-sensitiven Hauptbande läuft (vgl. auch Abb. 27a und b und Abb. 28a und b). Der Glykosylierungsstatus der restlichen Alanin-Mutanten korrelierte ebenfalls mit den Biotinylierungs-Daten (Ergebnisse nicht gezeigt).

B. Zilienlokalisationsstudien von PC2 fl-HA und PC2(1/703)HA unter Einfluss von Brefeldin A

Die Endo H-Daten zeigen, dass die Tripel-Alanin-Mutanten und das Volllängenprotein auf dem Weg zur Zilienmembran maximal vom ER bis zum Cis-Golgi-Apparat gelangt sein können. Die plasmamembranständige PC2(1/703)-Mutante scheint jedoch über diesen Golgi-Bereich hinaus transportiert worden sein (vgl. Abb. 30a und b; Cai et al., 1999; Cedzich, 2000). Da nach Jüschke et al. (2005) und Franz et al. (2007) Transmembranproteine durchaus auch Golgi-unabhängig vom ER zur Zellmembran gelangen können, stellte sich daher als nächstes die Frage, ab welchem Kompartiment - ER oder Cis-Golgi - Polycystin-2 bzw. seine nach Aminosäure 703 deletierte Mutante auf die Transportschiene zur Zilienmembran geleitet werden.

Immunzytochemische Zilienlokalisationsstudien in LLC-PK₁-Zellen für Polycystin-2 und seine nach Aminosäure 703 deletierte Mutante unter dem Einfluss von Brefeldin A (BFA), einem den Golgi-Apparat zerstörenden Agens, sollten daher zeigen, ob dieses Organell am „Zilien-Transport“ der beiden Proteine beteiligt ist. Bei BFA handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt in Form eines 13-teiligen makrozyklischen Lakton-Ringes, das ursprünglich aus *Penicillium brefeldianum* isoliert wurde (Haerri et al., 1963). Die morphologischen Veränderungen des Golgi-Apparates infolge von BFA konnten durch den immunzytochemischen Nachweis von Golgimarker-Proteinen wie galT aufgeklärt werden. So wird dieses Enzym wenige Minuten nach Zugabe des Giftes in Strukturen umverteilt, die mit Mikrotubuli kolokalisieren (Strous et al., 1991). Nach maximal einer Stunde ist keine Golgi spezifische Färbung mehr zu erkennen (vgl. auch weiter unten Abb. 32) und die Golgi-Markerproteine kolokalisieren mit solchen des ER (Dinter and Berger, 1998). Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) kollabiert um das Mikrotubuli organisierende Zentrum (MTOC) herum. Weiterhin scheint BFA den Transport innerhalb des Golgi-Apparates zu inhibieren, indem es die Coatomer-Bildung hemmt, die Bindung von ARFs (GTP bzw. GDP-bindende Proteine) an Membranen verhindert und auch Guanin-Nukleotid-Austauschproteine inhibiert (Orci et al., 1991; Morinaga et al., 1996; Liang und Kornfeld, 1997). Die Wirkung des Giftes ist reversibel.

Sollte also der Golgi-Apparat in den ziliären Transport von Polycystin-2 und PC2(1/703) involviert sein, so sollten beide Proteine infolge der BFA-Behandlung nicht mehr ins Zilium

gelangen. Umgekehrt sollte die Zilienlokalisierung der beiden Proteine völlig unbeeinflusst bleiben, wenn das ER bereits den Startpunkt für den Zilien-Weg darstellt. Da bisher kaum Erfahrungswerte für Inkubationszeiten von mehr als 48 Stunden für das Toxin BFA existieren (Andrieu et al., 1996; Dinter und Berger, 1998) und für eine genügend hohe Ziliendichte bei transienten Transfektionen aber mindestens 3 Tage Inkubationszeit nötig sind, wurde entschieden, stabil transfizierte, induzierbare LLC-PK₁-Zellen für PC2 fl-HA [LtTA-2,22/PKD2 fl-HA] und PC2(1/703)HA [LtTA-2,22/PKD2(1/703)HA] zu verwenden (s. auch 2.1.9.B). Diese Zellen synthetisieren konstitutiv unter der Kontrolle eines starken CMV-Promotors einen sog. Tetrazyklin-Transaktivator (tTA), der in Anwesenheit von Doxyzyklin die Transkription der jeweiligen Ziel-cDNA, die sich unter der Kontrolle eines tTA-abhängigen CMV-Minimalpromotors befindet, reprimiert. Um ein geeignetes Zeitfenster für die Applikation von BFA zu finden, wurde zunächst eine Induktionskinetik für die transfizierten Zellen erstellt. Hierzu wurden diese am Vortag des Experimentes unter Zugabe von Doxyzyklin ausgesät. Am nächsten Tag wurden Lysatproben als Nullwert genommen. Dann wurde über Doxyzyklinentzug mit der Induktion begonnen, wobei über einen Zeitraum von bis zu vier Tagen Lysatproben in 24 Stunden Intervallen erstellt wurden. Zeitgleich wurden als Kontrolle Lysatproben von Zellen genommen, die über den gesamten Versuchszeitraum unter Einfluss von Doxyzyklin kultiviert wurden. Anschließend wurden die Lysatproben einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10) unterzogen (Abb. 31a und b).

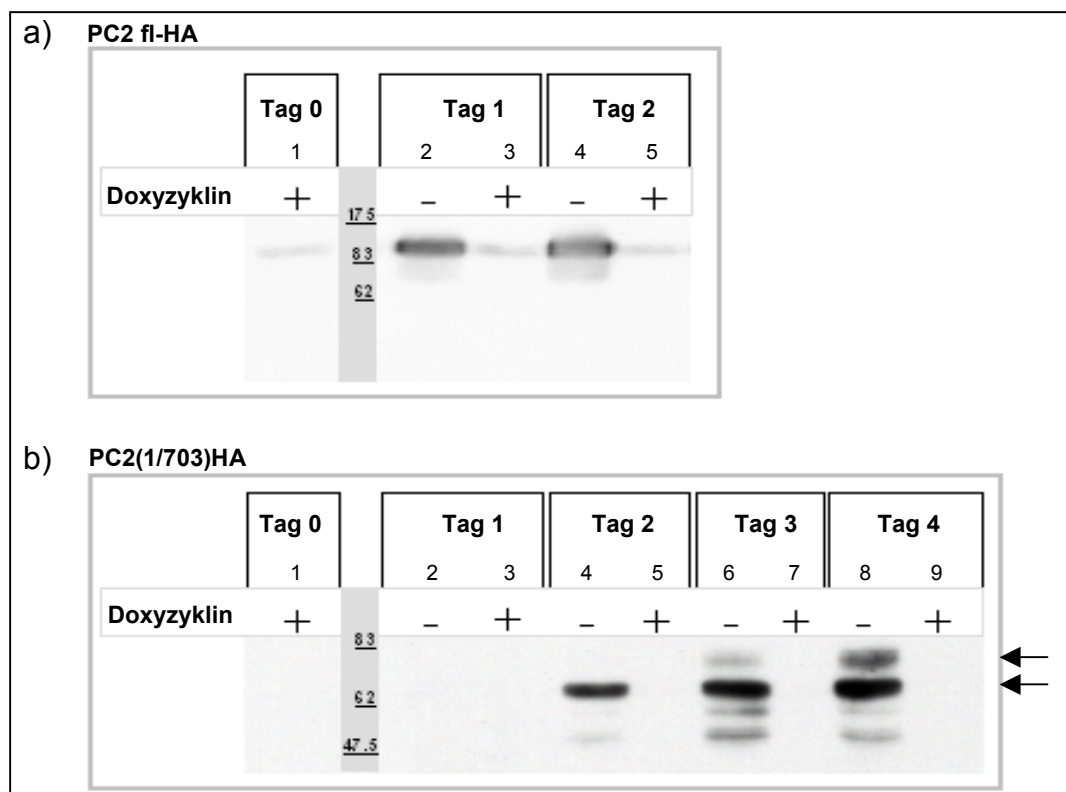


Abb. 31: Induktionskinetiken für LtTA-2,22/PKD2 fl-HA und LtTA-2,22/PKD2(1/703)HA. LtTA-2,22/PKD2 fl-HA (a) und LtTA-2,22/PKD2(1/703)HA (b) wurden in An- bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin über 2-4 Tage kultiviert (2.2.2.F). Im 24-Stunden-Takt wurden Lysatproben genommen (**Tag 1-2 bzw. 1-4**), wobei vor Beginn der Induktion ebenfalls eine Lysatprobe (**Tag 0**) genommen wurde. Anschließend wurden jeweils 50 µg Lysat auf 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele geladen, die auf PVDF-Membranen transferiert wurden (2.2.4.D). Die Membranen wurden mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (3F10; s. auch 2.1.7.A) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der obere Pfeil markiert die Endo H-resistente Fraktion von PC2(1/703)HA, der untere die Endo H-sensitive Fraktion (Daten nicht gezeigt). **PC2 fl-HA und PC2(1/703)HA werden in voller Länge translatiert, wobei PC2 fl-HA bereits nach 24 Stunden detektierbar ist und die Deletionsmutante erst nach 48 Stunden.**

Aus Abbildung 31a und b ist zu entnehmen, dass PC2 fl-HA [\sim 111 kDa] bereits nach 24 Stunden detektierbar ist und nach 48 Stunden ein zu Tag 1 vergleichbares Expressionsniveau zeigt (Abb. 31a, Spur 2 und 4). Bei PC2(1/703)HA [\sim 81 kDa] hingegen steigen die Proteinspiegel erst von Tag zwei bis vier kontinuierlich an (Abb. 31b, Spur 4, 6 und 8 Doppelpfeil). Allerdings scheint im Fall von PC2 fl-HA auch in Anwesenheit von Doxyzyklin eine basale Transkription bzw. Translation stattzufinden (Abb. 31a, Spur 1, 3 und 5), was auf einen nicht dichten Promotor hindeutet. Auf immunzytochemischer Ebene zeigte sich jedoch, dass bei Doxyzyklin-Zugabe weder PC2 fl-HA noch PC2(1/703)HA zu irgendeinem der in Abb. 31a und b gezeigten Induktionszeitpunkte im Zilium detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde beschlossen, PC2 fl-HA über 2 Tage zu induzieren und BFA bereits zum Induktionszeitpunkt zuzusetzen. Bei der nach Aminosäure 703 deletierten Mutante wurde hingegen entschieden, über einen Zeitraum von drei Tagen zu induzieren, wobei BFA erst nach 24 Stunden appliziert werden sollte. Um für die Untersuchung des Zilientransportwegs unter Einfluss von BFA zum Zeitpunkt der Fixierung eine genügend hohe Ziliendichte zu haben, wurden die entsprechenden Zellen am Vortag des Experimentes unter Anwesenheit von Doxyzyklin so ausgesät, dass sie am nächsten Tag bereits 100% konfluent waren. Einen Tag nach dem Aussäen wurden die Zellen durch Doxyzyklin-Entzug induziert. Die Zugabe von BFA bzw. Methanol als Lösungsmittel für BFA erfolgte nach dem weiter oben geschilderten Prinzip. Zeitgleich durchgeführte Kontrollen, bei denen Zellen unter Zugabe von Doxyzyklin kultiviert wurden, gewährleisten, dass keinesfalls Protein infolge eines undichten Promotors vor Zugabe von BFA (bzw. Methanol) ins Zilium gelangen konnte (Daten nicht gezeigt, siehe auch Versuchserläuterung für Abb. 31a und b). Nach der Fixierung und der anschließenden Permeabilisierung wurden die Zellen zum Nachweis der HA-markierten Proteine mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten anti-HA-Antikörper (aus Kaninchen) inkubiert, der mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. Für die Detektion von Zilien wurden die fixierten Zellen gleichzeitig mit einem gegen acetyliertes Tubulin gerichteten Antikörper (aus Maus) behandelt, der wiederum mit einem

FITC-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. Als funktionelle Kontrolle für BFA wurden Deckgläschen aus den jeweiligen Inkubationsschritten mit einem gegen das Golgi-Protein Giantin (an der Bildung von Quervernetzungen zwischen den Golgi-Zisternen beteiligt) gerichteten Antikörper inkubiert, der mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 32 dargestellt.

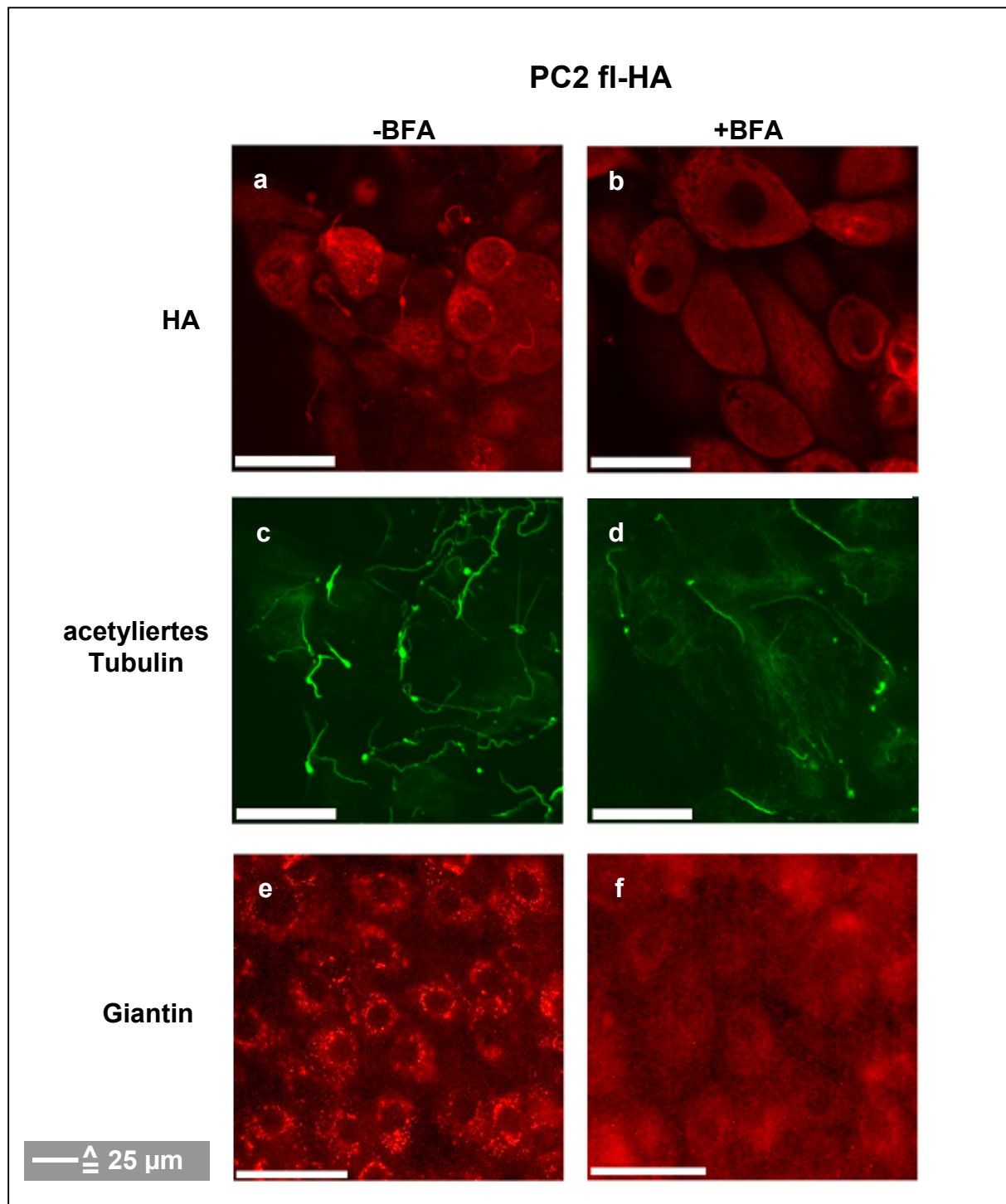


Abb. 32: Zilienlokalisationsstudie für PC2 fl-HA in LtTA-2,22-Zellen unter Einfluss von BFA. Die Zelllinie LtTA-2,22/PKD2 fl-HA (s. auch 2.1.9.B) wurde 48 Stunden lang unter Einfluss von BFA bzw. Methanol induziert. Nach der Fixierung mit PFA und der Permeabilisierung mit Triton X-100 (0,25%) erfolgte

die Inkubation mit folgenden Primärantikörpern. **a/b**: gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (anti-HA; s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). **c/d**: gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). **e/f**: gegen Giantin gerichteter Antikörper (s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). Danach wurden die Zellen an einem Zeiss LSM 510 photographiert (x40). **PC2 fl-HA muss in den Golgi-Apparat transportiert werden, um ins Zilium zu gelangen.**

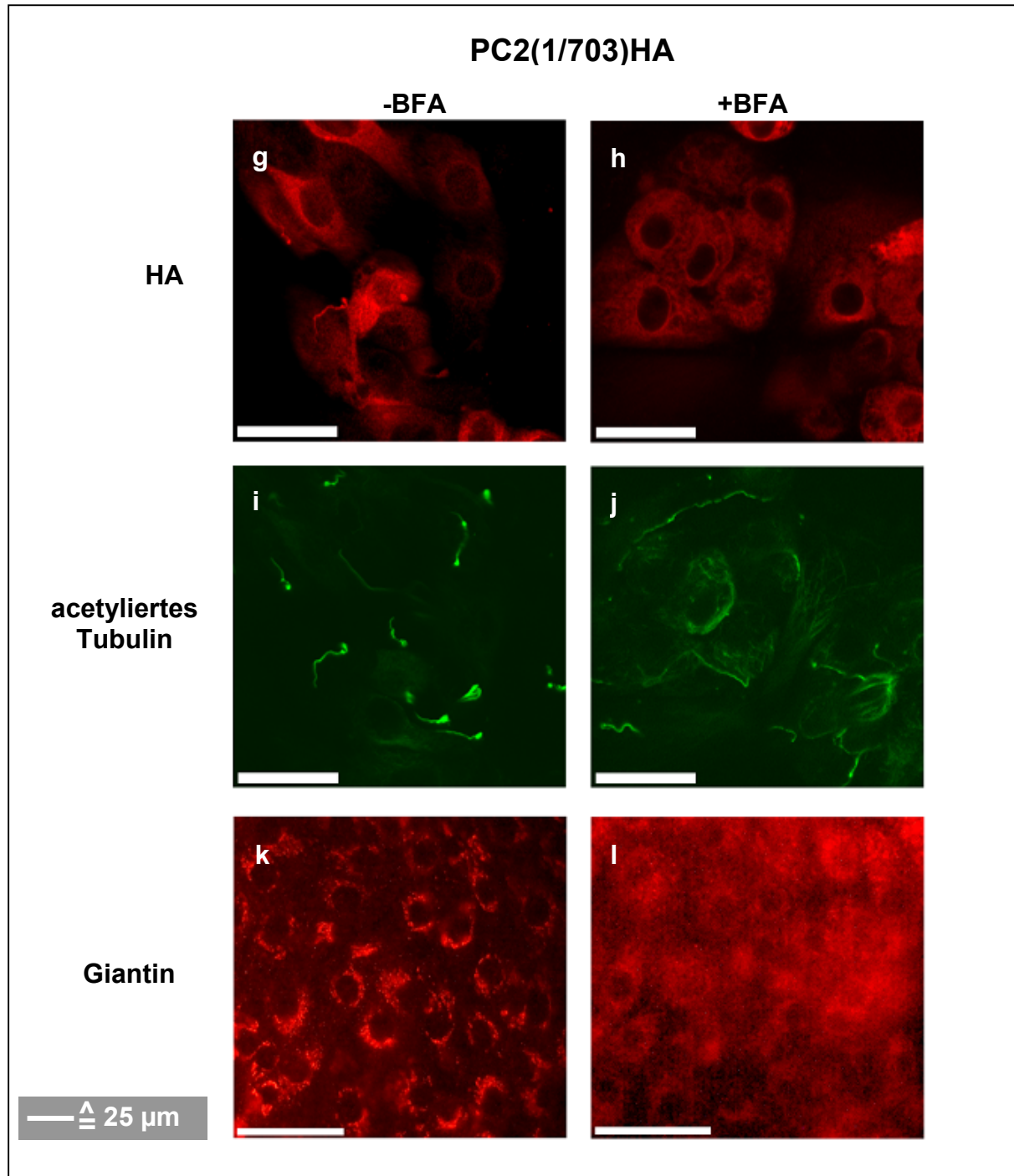


Abb. 32: Zilienlokalisationsstudie für PC2(1/703)HA in LtTA-2,22-Zellen unter Einfluss von BFA. Die Zelllinie LtTA-2,22/PKD2(1/703)HA (s. auch 2.1.9.B) wurde 72 Stunden lang unter Einfluss von BFA bzw. Methanol induziert, wobei BFA bzw. Methanol erst nach 24 Stunden Induktion zugegeben wurden. Nach der Fixierung mit PFA und der Permeabilisierung mit Triton X-100 (0,25%) erfolgte die Inkubation mit folgenden Primärantikörpern. **g/h**: gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (anti-HA; s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). **i/j**: gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen FITC-gekoppelten

Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). **k/I:** gegen Giantin gerichteter Antikörper (s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). Danach wurden die Zellen an einem Zeiss LSM 510 fotografiert (x40). **PC2(1/703)HA muss in den Golgi-Apparat transportiert werden, um ins Zilium zu gelangen.**

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) ergab sich, dass mit BFA die Zilienbildung bei LLC-PK₁-Zellen inhibiert wird, was impliziert, dass durch die Zerstörung des Golgi-Apparates der Nachschub an für den Aufbau eines Ziliums wichtigen Bestandteilen intrazellulär zurückgehalten wird. Dieser Aspekt kommt vor allem in der Tubulin-Färbung bei den Zellen deutlich zum Ausdruck, die das Volllängenprotein [LtTA-2,22/PKD2 fl-HA] synthetisieren (vgl. Abb. 32c und d). Die Zerstörung des Golgi-Apparates (vgl. auch Abb. 32e und f bzw. g und h) scheint weiterhin auch der Grund dafür zu sein, dass weder das Wildtyp-Protein (Abb. 32b) noch die nach Aminosäure 703 (Abb. 32h) abgeschnittene Mutante in Gegenwart von BFA in den verbliebenen Zilien nachgewiesen werden konnten (selbst bei deutlich erhöhten Belichtungszeiten waren keine PC2-positiven Zilien zu sehen). Bei den mit Methanol behandelten Kontroll-Zellen hingegen ist zu erkennen, dass beide Proteine ohne weiteres in die ziliäre Plasmamembran integriert werden (Abb. 32a und g). Die Beobachtung, dass das Wildtyp-Protein und PC2(1/703) bei den Kontroll-Zellen nicht immer ins Zilium gelangen, wurde auch bei LLC-PK₁-Zellen gemacht, die mit dem Vektor für PC2(1/703)HA oder PC2 fl-HA transient transfiziert waren. Da bisher nur wenig über den intrazellulären Transportweg von Proteinen zum Zilium bekannt ist, muss davon ausgegangen werden, dass Aspekte wie z.B. der Stoffwechselzustand einer Zelle oder der „Reifungsgrad eines Ziliums“ ebenfalls Einfluss auf die Zilienlokalisierung von Proteinen nehmen. Nichtsdestotrotz kann man jedoch eindeutig erkennen, dass der Golgi-Apparat in den ziliären Transport von Polycystin-2 und seiner Deletionsmutante involviert sein muss, da die Daten zeigen, dass beide Proteine den Golgi-Apparat benötigen, bevor sie ins Zilium gelangen. Den Endo H-Daten aus Abbildung 30a nach zu urteilen müsste der Transportweg zur Zilienmembran demnach vom Cis-Golgi-Kompartiment abzweigen (Rothman and Fine, 1980).

C. Zilienlokalisationsstudien für PC2(1/703)HA unter Einfluss von Sar1a H79G und Sar1a T39N

Um zu überprüfen, ob Polycystin-2 und seine nach Aminosäure 703 deletierte Mutante auf ihrem Weg zum Zilium den (Cis-)Golgi-Apparat passieren, sollte ein weiterer funktioneller Assay durchgeführt werden. Hierbei sollten zwei dominant negative Sar1a-Mutanten namens Sar1a H79G und Sar1a T39N zum Einsatz kommen, bei denen es sich um Punktmutanten des

Sar1a-Proteins handelt (Kuge et al., 1994; Pepperkok et al., 1998). Bei Sar1a handelt es sich um eine kleine lösliche GTPase, die neben dem zytosolischen Sec 23/24-Heterodimer-Komplex und dem zytosolischen Sec 13/31-Heterotetramer-Komplex einen Bestandteil der sog. „COPII-Maschinerie“ bildet, die für den Export der meisten Proteine aus dem ER zum Golgi-Apparat verantwortlich ist (Barlowe, 2003a; Aridor et al., 2005). Sar1a inseriert über seinen N-Terminus in die ER-Membran und ist weiterhin in der Übergangszone des ER und den vorderen Zisternen des Golgi-Apparates lokalisiert (Kuge et al., 1994; Sato und Nakano, 2007). Nach Beladung von Sar1a mit GTP durch den ER-membranständigen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sec12 (GEF) ist dieses aktiv, bindet an die ER-Membran und rekrutiert den Sec 23/24-Komplex, der die zu transportierende Ladung auswählt, um einen sog. „prebudding-Komplex“ zu bilden. Dieser Komplex wiederum rekrutiert Sec13/31, das die Außenschicht der Vesikelhülle bildet und vermutlich die „prebudding-Komplexe“ vernetzt und die Membrandeformation zur Vesikelbildung auslöst (Sato und Nakano, 2007). Die Hydrolyseaktivität von Sar1a, die durch Sec23 (GAP) vermittelt wird, ist nicht nur für die Hüll-Polymerisierung, sondern auch für das sog. „Uncoating“ von Vesikeln verantwortlich, das wiederum für die Fusion mit dem Cis-Golgi-Apparat von Nöten ist (Oka et al., 1994). Weitere biochemische Analysen bestätigten, dass Sar1a demnach essentiell für die frühen Schritte der Vesikelabschnürung beim Export von Proteinen aus dem ER ist, aber für den Protein-Transport durch die nachfolgenden Golgi-Kompartimente keinerlei Bedeutung hat (Kuge et al., 1994). Beide Sar1a-Mutanten verhindern den ER-Export, wobei Sar1a H79G nicht mehr in der Lage ist, GTP zu GDP zu hydrolysieren. Nach Beobachtungen von Pepperkok et al. (1998) sorgt die Mutante dafür, dass der Hauptanteil des zu transportierenden Zielproteins im ER arretiert wird, da die Polymerisierung der Vesikelhülle gestört ist. In Gegenwart dieser Mutante können sich zwar noch vereinzelt Vesikel abschnüren (und in Richtung Golgi wandern), diese können aber nicht mehr ihre Hülle abstreifen. Die inhibierende Wirkung von Sar1a H79G auf die Neubildung von COPII-Vesikeln kommt demnach vermutlich auch dadurch zustande, dass der zytosolische Pool an COPII-Bestandteilen mehr und mehr in fusionsdefiziente Vesikel übergeht (Pepperkok et al., 1998). Sar1a T39N zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Protein zwar eine unveränderte Affinität zu GDP, seine Affinität gegenüber GTP ist jedoch deutlich herabgesetzt. Wahrscheinlich kompetitiert Sar1a T39N mit dem Wildtyp-Protein um einen für Sar1a spezifischen GEF, was sich wiederum störend auf die Rekrutierung von Sar1a an die ER-Membran auswirkt (Kuge et al., 1994). Daher sorgt auch diese Mutante dafür, dass sich keine sog. „coated Vesikel“ mehr vom ER abschnüren können.

Bei Wildtyp-Polycystin-2 und der nach Aminosäure 703 deletierten Mutante konnten bezüglich ihres Transportweges zum Zilium vergleichbare Beobachtungen bei den BFA-Experimenten (3.2.4.B) gemacht werden. Daher wurde entschieden, den Zilientransportweg durch transiente Koexpression von PC2(1/703)HA mit je einer der beiden Sar1a-Punktmutanten in LLC-PK₁-Zellen zu untersuchen, da die Deletionsmutante bessere Transfektionsraten als das Wildtyp-Protein in diesen Zellen zeigte. Hierzu wurden die für den Aminosäurebereich 1-197 kodierenden cDNA-Sequenzen der genannten Sar1a-Mutanten so in den pECFP-C1-Vektor (siehe auch 2.1.8.A) inkloniert, dass die Punktmutanten von Sar1a an ihrem N-Terminus mit ECFP fusioniert wurden. Anschließend wurden LLC-PK₁-Nierenzellen mit dem Vektor pECFP-C1/Sar1a H79G bzw. pECFP-C1/Sar1a T39N und dem Vektor für PC2(1/703)HA transient transfiziert. Beide Vektoren enthalten einen starken, konstitutiven CMV-Promotor, so dass angenommen werden kann, dass die cDNAs der zu koexprimierenden Proteine zeitgleich und mit vergleichbarer Effizienz transkribiert werden. Als funktionelle Kontrolle für die Sar1a-Mutanten diente die gleichzeitige Synthese des Plasmamembranproteins CD8. Um weiterhin sicherzustellen, dass die gleichzeitige Synthese von 2 Proteinen bzw. das angehängte ECFP keinerlei Einfluss auf den Ausgang der Experimente nehmen, wurden zusätzlich transiente Kotransfektionen des nur für ECFP kodierenden Vektors (pECFP-C1) mit den Plasmiden für PC2(1/703)HA und CD8 durchgeführt. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, um einen relativ hohen Differenzierungsgrad und damit verbunden eine hohe Ziliendichte zu erreichen. Um die Synthese von PC2(1/703)HA überprüfen zu können, wurden die entsprechenden Zellen mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten anti-HA-Antikörper (aus Kaninchen) inkubiert, der mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (vgl. auch Abb. 33c und d, HA). Ein gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (aus Maus) wurde zur Zilien-Detektion verwendet und mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (vgl. Abb. 33c und d, acetyliertes Tubulin). Das Kontroll-Protein CD8 wurde mit einem Antikörper nachgewiesen, der über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper identifiziert wurde (vgl. auch Abb.33a und b, CD8). Die Detektion von ECFP bzw. den ECFP-Sar1a-Mutanten erfolgte über die intrinsische Fluoreszenzeigenschaft von ECFP (vgl. Abb. 33a-d, ECFP-Signal). Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 33a-d anhand von ECFP-Sar1a H79G exemplarisch dargestellt.

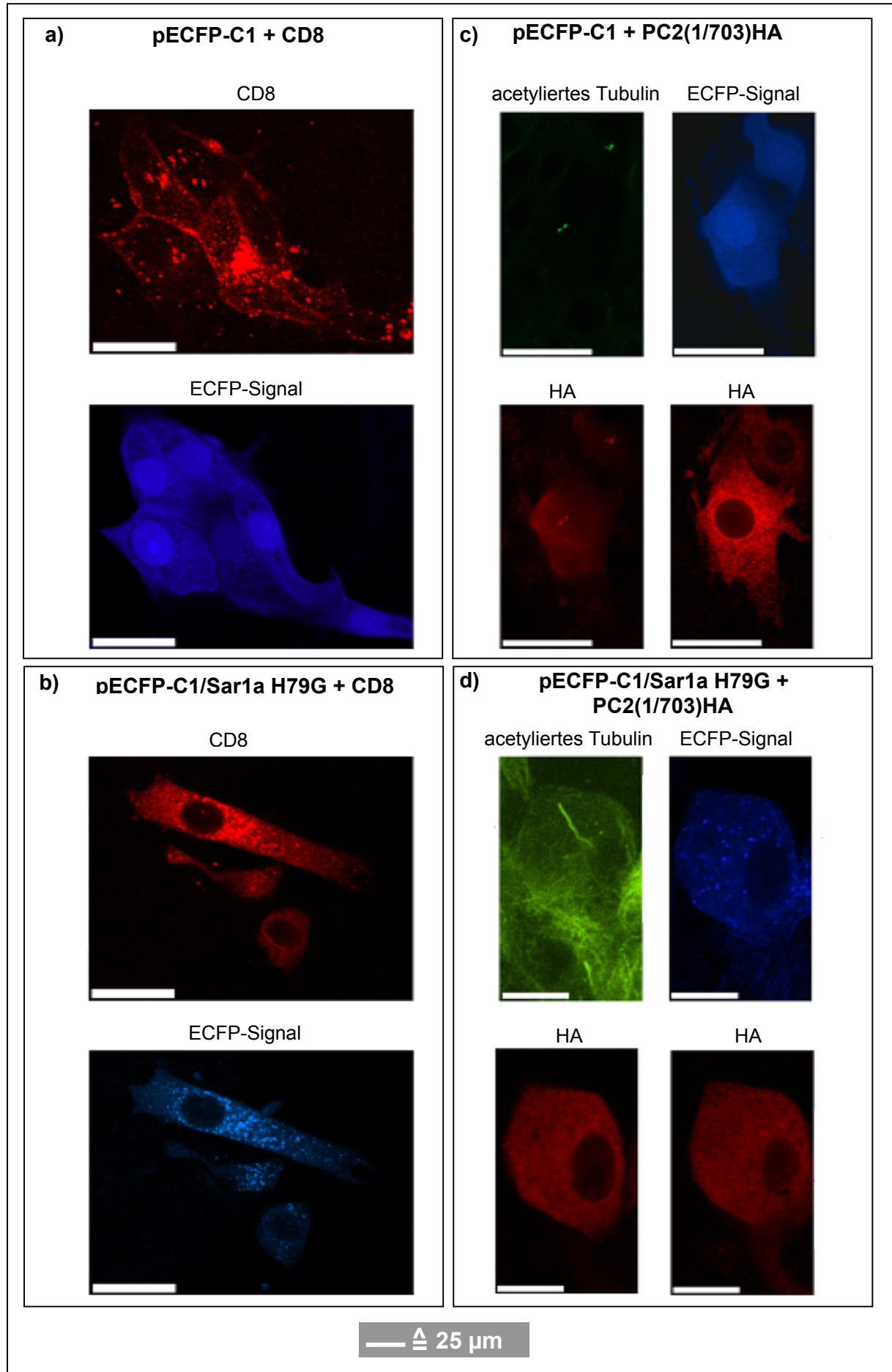


Abb. 33: Zilienlokalisationsstudien für PC2(1/703)HA in LLC-PK₁-Zellen unter Einfluss von Sar1a H79G. Transient transfizierte LLC-PK₁-Zellen [6 µg pcDNA3/PKD2(1/703)HA bzw. pcDNA3/CD8 und 8 µg pECFP-C1 bzw. pECFP-C1/Sar1aH79G] wurden 3 Tage nach der Transfektion mit PFA fixiert und mit Triton X-100 (0,25%) permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den folgenden Primärantikörpern. **a und b:** ECFP-Signal/gegen CD8 gerichteter Antikörper (OKT 8, s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). **c und d:** ECFP-Signal/gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (anti-HA, s. auch 2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B)/gegen acetyliertes Tubulin gerichteter Antikörper (2.1.7.A); die Detektion erfolgte über einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). Danach wurden die Zellen an einem Zeiss LSM 510 photographiert (x63). **PC2(1/703)HA muss über COPII-Vesikel aus dem ER exportiert werden, um ins Zilium zu gelangen.**

Bei Betrachten von Abbildung 33a wird deutlich, dass CD8 in Gegenwart von ECFP problemlos die Plasmamembran erreicht. Unter dem Einfluss von ECFP-Sar1a H79G wird das Plasmamembranmarkerprotein jedoch intrazellulär zurückgehalten und kolokalisiert mit der Mutante in Form von vesikulären Strukturen (vgl. auch Abb. 30b). Dieser Befund spiegelt die Beobachtungen von Pepperkok et al. (1998) wider, die besagen, dass in Gegenwart der Sar1a-Mutante Plasmamembranproteine im ER zurückgehalten werden. Es kann zwar noch vereinzelt zur Abschnürung von Vesikeln kommen, diese sind jedoch nicht mehr in der Lage, ihre Hülle abzustreifen und können somit nicht mehr mit dem Golgi-Apparat fusionieren. Fokussiert man nun den apikalen Zellmembranbereich einer Zelle, die ECFP-Sar1a H79G und PC2(1/703)HA synthetisiert (Abb. 30d), so sieht man, dass PC2(1/703)HA nicht mehr ins Zilium gelangt. Dieser Befund konnte an 10 weiteren Zellen nachvollzogen werden. Bei der Synthese von ECFP und PC2(1/703)HA (vgl. auch Abb. 30c) hingegen war die Deletionsmutante von Polycystin-2 bei 10 von 14 Zellen im Zilium zu sehen. Da PC2 fl-HA bzw. PC2(1/703)HA auch in LLC-PK₁-Zellen, die diese Proteine alleine synthetisieren, nicht immer im Zilium zu finden sind (Gründe siehe auch 3.2.4.B), kann daher im Hinblick auf die in Abbildung 33a-c gezeigten Kontrollexperimente davon ausgegangen werden, dass weder die Koexpression noch das angehängte ECFP als Grund für die in Abbildung 33d gezeigte Inhibierung des Zilientransportes von PC2(1/703)HA in Frage kommen. Demnach stellt also der gestörte COPII-vermittelte ER-Export in Anwesenheit von Sar1a H79G die alleinige Ursache für das Ausbleiben der Translokation von PC2(1/703)HA zur ziliären Plasmamembran dar. Die Tatsache, dass in Abbildung 33d keine Kolokalisation zwischen ECFP-Sar1a H79G und PC2(1/703)HA in Form von vesikulären Strukturen zu sehen ist wie sie bei CD8 und der ECFP-Sar1a-Mutante zu beobachten war (Abb. 33b), könnte demnach darin begründet sein, dass Sar1a H79G das Abschnüren von PC2(1/703)HA-haltigen Transport-Vesikeln vollständig zu unterbinden vermag. Die Abhängigkeit der Zilienlokalisation von PC2(1/703)HA vom COPII-Vesikel-Transport konnte auch durch Verwendung der Sar1a T39N-Mutante gezeigt werden. Mit 4 von 14 PC2(1/703)HA-

positiven Zilien ergab sich auch hier der Hinweis, dass Sar1a T39N den Transport der Deletionsmutante von Polycystin-2 zum Zilium blockiert. Die Tatsache, dass Sar1a T39N den ER-Export nicht vollständig unterdrücken kann, wird durch Daten von Kuge et al. (1994) bestätigt. So konnte die Mutante in HeLa-Zellen den ER-Export von tsO45-VSV-G zum Teil auch nur um bis zu 80-90% reduzieren, obwohl die Sar1a-Mutanten-DNA in 2,5-fachem Überschuss zugegeben wurde (Kuge et al., 1994).

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass sowohl die Brefeldin A-Daten als auch die Daten mit den dominant-negativen Mutanten von Sar1a nahelegen, dass Polycystin-2 und seine nach Aminosäure 703 deletierte Mutante über COPII vermittelten Transport vom ER zum Golgi-Apparat gebracht werden müssen, um zum Zilium zu gelangen. Die Endo H-Daten (Abb. 30a) lassen den Schluss zu, dass es sich um das Cis-Golgi-Kompartiment handeln muss.

3.2.5 Golgi-Kolokalisationsstudien von PC2 fl und PC2(1/703)

Die Experimente der vorausgegangenen Kapitel legen die Vermutung nahe, dass Wildtyp-Polycystin-2 und seine nach Aminosäure 703 deletierte Mutante nach ihrem COPII vermittelten ER-Export vom Cis-Golgi-Bereich aus ins Zilium gelangen. Immunzytochemisch war jedoch bei LLC-PK₁-Zellen, die transient mit den Vektoren für PC2 fl-HA und PC2(1/703)HA transfiziert waren, keinerlei Kolokalisation der genannten Proteine mit dem Cis-Golgi-Marker GM130 festzustellen (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund war unabhängig davon, ob die Proteine bei den jeweils untersuchten Zellen im Zilium detektierbar waren oder nicht. Eine Erklärung für das Ausbleiben der Kolokalisation könnte in der Menge an nachweisbarem Protein liegen. Bei einer transienten Transfektion erreicht die Proteinexpression ungefähr nach achtundvierzig Stunden ihren Höhepunkt und fällt dann in der Regel wieder ab. Daher ist es vermutlich schwer, den optimalen Zeitpunkt abzapfen, vor allem, wenn die Transportkinetiken sehr schnell sind. Letzterer Aspekt ist vermutlich auch der Grund, warum selbst bei stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen keinerlei Kolokalisation von PC2(1/703) mit einem weiteren Golgi-Markerprotein wie Giantin (an der Bildung von Quervernetzungen zwischen den Golgi-Zisternen beteiligt) gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), obwohl die Endo H-Daten (vgl. Abb. 30a) eindeutig dafür sprechen, dass die Mutante über das Cis-Golgi-Kompartiment hinaus durch den Golgi-Apparat geschleust wird. Um daher zu untersuchen, ob Wildtyp-Polycystin-2 und seine nach Aminosäure 703 deletierte Mutante den Cis-Golgi-Bereich passieren, wurde beschlossen,

stabil transfizierte LLC-PK₁-Zellen herzustellen, die gleichzeitig induzierbar Fusionsproteine zwischen diesen beiden Proteinen und EGFP und konstitutiv Golgi-Markerproteine, fusioniert mit einem „Far red fluoreszierenden Protein“, synthetisieren. Im Anschluss sollten dann mikroskopische Untersuchungen in Echtzeit durchgeführt werden. Hierzu wurden die für PC2 fl-HA bzw. PC2(1/703)HA kodierenden Sequenzen C-terminal mit der für EGFP kodierenden cDNA fusioniert und in den pUHD10-3-Vektor kloniert, der eine tet-Operator-Sequenz besitzt (siehe auch 2.1.8.A und 2.1.9.B). Diese Konstrukte wurden dann in LtTA-2,22-Zellen kotransfiziert, die konstitutiv den sog. Tetrazyklin-Transaktivator (tTA) produzieren (siehe auch 2.1.8.A und 2.1.9.B). Auf diese Weise kann die Synthese der Zielproteine über Zugabe von Doxyzyklin reprimiert und durch dessen Entzug angeschaltet werden. Im Rahmen der Doktorarbeit konnten Zellklone gepickt werden, die beide Proteine produzierten (siehe auch 2.2.2.E). In Abbildung 34 sind Induktionskontrollen für insgesamt 3 der Klone dargestellt. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen 3 Tage lang in An- bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin kultiviert. Im Anschluss wurden Zelllysate hergestellt und einer Western-Blot-Analyse mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (12CA5) unterzogen. Der Versuch ist in Abbildung 34 dargestellt.

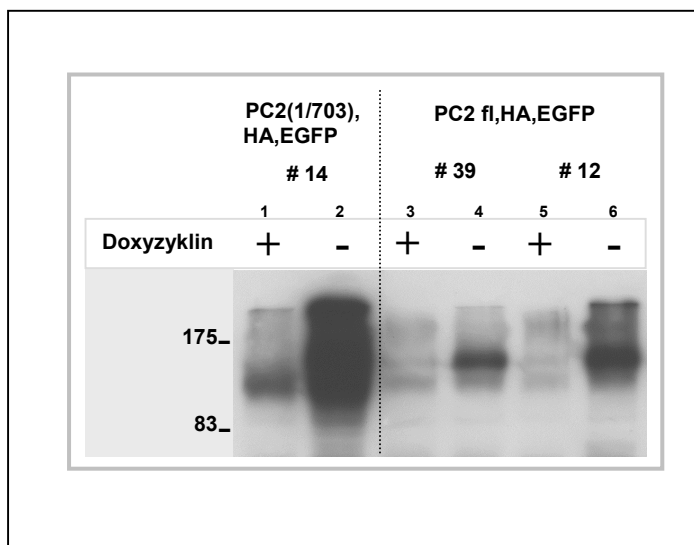


Abb. 34: Induktionskontrollen für LtTA-2,22/PKD2(1/703),HA,EGFP und LtTA-2,22/PKD2 fl,HA,EGFP. LtTA-2,22/PKD2 fl,HA,EGFP und LtTA-2,22/PKD2(1/703),HA,EGFP wurden in An- bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin über 3 Tage kultiviert (2.2.2.F). Im Anschluss wurden Lysatproben genommen, wobei jeweils 80 µg Lysat auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen wurden, das auf eine PVDF-Membran transferiert wurde (2.2.4.D). Die Membran wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper (12CA5; 2.1.7.A) inkubiert. Die Banden-Detektion erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (s. auch 2.1.7.B). Die Zahlenangaben entsprechen den Klon-Nummern (aufgrund der hohen Gel-Prozentigkeit und der Überexponierung kann bei PC2(1/703)HA hier keine Plasmamembran-Bande detektiert werden; auf immunzytochemischer Ebene konnte das Protein aber von Dr. Karin Babinger an der Plasmamembran nachgewiesen werden). **Die EGFP-Fusionsproteine aller drei gezeigten Klone werden regulierbar und in voller Länge translatiert.**

Aus Abbildung 34 ist zu ersehen, dass sowohl PC2(1/703),HA,EGFP (~111 kDa) als auch PC2 fl,HA,EGFP (~140 kDa) von den entsprechenden Klonen regulierbar synthetisiert werden. Bei PC2(1/703)HA,EGFP ist allerdings auch in Anwesenheit von Doxyzyklin eine basale Transkription bzw. Translation zu sehen, was auf einen undichten Promotor hindeutet. Diese Proteinmenge ist jedoch im Hinblick auf die große Menge des Fusionsproteins in Abwesenheit von Doxyzyklin vergleichsweise gering. Die vollständige Translation bzw. regulierbare Expression der Proteine konnte auch auf immunzytochemischer Ebene gezeigt werden, da induzierte Zellen im Vergleich zu uninduzierten deutlich grün fluoreszierten (pers. Mitteilung Dr. Karin Babinger). Da allerdings das mit EGFP fusionierte Volllängenprotein vermutlich aufgrund einer durch das angehängte EGFP-Protein veränderten Faltung nicht ins Zilium gelangen konnte (pers. Mitteilung Dr. Karin Babinger) wurde diese Methode nicht weiterverfolgt, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass EGFP nicht auch den gesamten intrazellulären Transport von Polycystin-2 verändert bzw. stört.

3.3 Quantifizierung der Interaktion von Polycystin-2 mit Polycystin-1 und PIGEA-14 über Quarzmikrowaagechnik

Für Polycystin-2 konnten bisher 15 Interaktionspartner identifiziert werden (vgl. 1.6). Bis auf ein Protein binden alle ausschließlich bzw. unter anderem an dem zytoplasmatisch exponierten C-Terminus von PC2 (vgl. 1.6). Bisher ist jedoch nur relativ wenig über die Funktionalität bzw. Regulation dieser Wechselwirkungen bekannt. Um die Interaktionen von Polycystin-2 mit seinen C-terminalen Interaktionspartnern besser charakterisieren zu können, sollten daher über sog. Bindungstests thermodynamische und kinetische Bindungsparameter ermittelt werden. Der Vergleich der quantitativen Analysen sollte dazu beitragen, die physiologische Relevanz der einzelnen Interaktionen besser beurteilen zu können. Im Fokus der Arbeit stand die Interaktion des C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) mit dem C-Terminus von Polycystin-1 (PC1C) bzw. PIGEA-14.

Eine gängige Methode zur Bestimmung von Bindungsparametern wie der Dissoziationskonstante stellen sog. Saturationsbindungsstudien dar. Bei derartigen Studien wird die spezifische Ligandbindung im Gleichgewichtszustand gemessen, wobei der freie, (meist) radioaktiv markierte Ligand vom Bindungsprotein-Ligandenkomplex abgetrennt wird, indem Größenunterschiede (Gelfiltrationssäulen), Ladungsunterschiede (Ionenaustauschfilter) oder Adsorptionsunterschiede (Glasfaserfilter oder PVDF-Membranen) zwischen dem freien

Liganden und dem Bindungsprotein-Ligandenkomplex ausgenutzt werden (Rehm, 2006). Die genannten Techniken haben jedoch einige Nachteile. So erweisen sich die unverzichtbaren Waschschriffe bei den auf Filtration basierenden Techniken für Interaktionen mit schnellen „ k_{off} -Raten“ als problematisch. Bei Gelfiltration kann es außerdem häufig zu unspezifischen Interaktionen des Bindeproteins mit dem Gelmaterial kommen, oder es liegen Einlagerungen des Liganden in hochmolekularen Pufferbestandteilen vor (z.B. kleine hydrophobe Liganden in Triton-Mizellen). Da zudem viele Ligandproteine eine radioaktive Markierung oft nicht vertragen (Rehm, 2006), wurde daher entschieden, eine markierungsfreie Methode wie die Quarzmikrowaage zu wählen. Diese Methode zeichnet sich weiterhin dadurch aus, dass der Bindungsprozess zeitaufgelöst betrachtet werden kann und mit relativ geringen Proteinkonzentrationen gearbeitet werden kann, da bereits Massenänderungen von wenigen Nanogramm nachweisbar sind (Schuhmacher, 1990; Janshoff et al., 2000).

3.3.1 Quarzmikrowaagetechnik (QCM)

Das Quarz Crystal Microbalance-System ist ein akustischer Mikrosensor, der zur Detektion kleinster Massenänderungen geeignet ist (Schuhmacher, 1990). Das Herzstück einer Quarzmikrowaage ist ein Schwingquarz-Plättchen mit piezoelektrischen Eigenschaften. Wird aus einem Quarzkristall eine Scheibe von 0,33 mm Dicke in einem Winkel von $35^{\circ} 10'$ zur optischen Achse herausgeschnitten, so trägt die Scheibe gegensätzliche Ladungen auf beiden Oberflächen. Werden nun Elektroden in Form von Goldfilmen auf das Plättchen aufgebracht und eine elektrische Spannung angelegt, so kommt es zu einer Verformung des Quarzes (reziproker piezoelektrischer Effekt), welcher in der Folge eine Scherbewegung, auch Dickenscherschwungung genannt, ausführt. Die Scherwelle wird an der Grenzschicht zwischen Luft und Quarz reflektiert, wodurch eine stehende Welle entsteht, deren Resonanzfrequenz durch die Dicke der Quarzscheibe festgelegt wird (Steinem, 2002). Durch eine gleichmäßige Massenablagerung wird die Dicke des Quarzes vergrößert, wodurch die Welle verlängert wird und die Resonanzfrequenz absinkt. Für die im Rahmen des Kooperationsprojektes durchgeführten Messungen (Bosk, 2007) wurde eine Lipidschicht aus DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) und DOGS-NTA-Ni (Dioleoyl-*sn*-glycero-3- $\{[N-(5\text{-amino-1-carboxypentyl})\text{iminodiessigsäure}]\text{-succinyl}\}$) in einem Stoffmengenverhältnis von 9:1 auf die Quarzscheibe aufgebracht. Auf diese Weise können mit einem His-Epitop fusionierte Proteine auf der Scheibe immobilisiert werden. Nach der Adsorption an die Membran werden die ungebundenen Proteine durch Spülen entfernt und die entsprechenden

Bindepartner dazugegeben. Nach Sauerbrey et al. (1959) verhält sich die Änderung der Resonanzfrequenz Δf direkt proportional zu der abgeschiedenen Masse, so dass der unter 2.2.4.K gezeigte Term, der die Abhängigkeit der Frequenzänderung Δf_e (maximale Frequenzänderung nach Zugabe einer definierten Ligandkonzentration $c_{L,0}$; vgl. auch 2.2.4.K) von der Ligandkonzentration $c_{L,0}$ beschreibt, zur Errechnung des K_d -Wertes herangezogen werden kann (vgl. auch 2.2.4.K). Über eine Auftragung der sog. konzentrationsabhängigen Ratenkonstante k_s (beschreibt die Krümmung der exponentiellen Abnahme der Resonanzfrequenz während der Ligandbindung; vgl. auch 2.2.4.K) als Funktion der zugegebenen Ligandkonzentration $c_{L,0}$ kann dann der k_{off} -Wert (Dissoziationsratenkonstante) aus dem y-Achsenabschnitt und der k_{on} -Wert (Assoziationsratenkonstante) aus der Steigung abgelesen werden (vgl. auch 2.2.4.K).

3.3.2 Proteinaufreinigungen für die Quarzmikrowaage-Messungen

Da es sich bei Quarzmikrowaagemessungen um Interaktionsstudien handelt, die folglich eine native Proteinstruktur erfordern, wurde versucht, sämtliche Proteine unter nativen Bedingungen aufzureinigen, da viele Proteine nach Behandlung mit denaturierenden Agenzien wie Harnstoff oder Guanidinium-Hydrochlorid nicht unbedingt vollständig renaturieren. Weiterhin wurde bei den Aufreinigungen auf die Verwendung des häufig zur Solubilisierung von Proteinen verwendeten, nichtionischen Detergens Triton X-100 verzichtet, da sich dieses aufgrund seiner niedrigen CMC sehr schlecht per Dialyse aus Proteinlösungen entfernen lässt und somit die Lipidschicht aus DOPC/DOGS-NTA-Ni auf der Quarzmikrowaage zerstören könnte.

Zunächst wurde die Strategie verfolgt, den C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) über ein His-Epitop an der Waage zu immobilisieren und die Bindungspartner als GST-Fusionsproteine zu dem immobilisierten C-Terminus von PC2 zu geben. Als Negativ-Kontrolle war die Aufreinigung von GST angedacht. Die klonierten Aminosäurebereiche für den C-Terminus von PC2 sowie die klonierten Aminosäurebereiche für PC1C und PIGEA-14 entsprachen dabei den unter Abbildung 35 gemachten Angaben (siehe auch weiter unten). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aufreinigung von GST als Negativ-Kontrolle bzw. des His-fusionierten C-Terminus von PC2 saubere Proteine im erwarteten Molekulargewichtsbereich ergab (Daten nicht gezeigt). Die Aufreinigung der GST-fusionierten Bindungspartner von PC2 erwies sich jedoch als problematisch. So wurde das

PC1C-Fusionsprotein vermutlich bereits im Bakterium degradiert (Kapzan, 2006) und das PIGEA-14-Fusionsprotein eluierte nicht sauber von der Säule, da unterhalb der Hauptbande ein Bandenschmier zu erkennen war, der Western-Blot-Analysen mit einem anti-GST bzw. anti-PIGEA-14-Antikörper nach zu urteilen durch unvollständige Translation bzw. Degradierung bedingt war (Daten nicht gezeigt). Da also PC1C über eine N-terminale GST-Fusion nicht in voller Länge aufzureinigen war und für die vergleichenden quantitativen Analysen jedoch sämtliche Bindungspartner in identischer Form vorliegen sollten, wurde daher entschieden, eine neue Strategie einzuschlagen. Anstelle des C-Terminus von PC2 sollten die Bindungspartner über ein His-Epitop an der Quarzmikrowaage immobilisiert werden. Der C-Terminus von PC2 sollte dann in einem zweiten Schritt auf die Quarzmikrowaage gegeben werden. Als Negativ-Kontrolle sollte das humane LIM-Domänenbindende Protein CLIM1 (= LDB2), das als Transkriptions-Koaktivator fungiert, an der Quarzmikrowaage immobilisiert werden, da dieses keinesfalls mit Polycystin-2 interagiert. Hierzu wurden die unter Abbildung 35 gezeigten Konstrukte hergestellt.

T7-Epitop	AS 266-373 von hCLIM1	6x His	pET21b/CLIM1: ~14 kDa
T7-Epitop	AS 4190-4302 von hPC1C	6x His	pET21b/PKD1C: ~14,6 kDa
T7-Epitop	AS 1-126 von hPIGEA-14	6x His	pET21b/PIGEA-14: ~17,2 kDa
MBP	HRV 3C-Spaltstelle	AS 680-968 von hPC2	pMAL-c2/PKD2C: ~76,8 kDa

Abb. 35: Schematische Darstellung der Konstrukte für die Quarzmikrowaagemessungen.

Um zu gewährleisten, dass die zu untersuchenden Bindungspartner von Polycystin-2 in voller Länge translatiert werden, wurden diese so in pET21b inkloniert, dass sie N-terminal mit einem T7-Epitop und C-terminal mit einem His-Epitop fusioniert vorlagen. Durch Aufreinigung über Nickel-Säulen sollten demnach nur solche Proteine eluiert werden, die vollständig synthetisiert wurden, wobei als Kontrolle für die vollständige Translation auch Western-Blot-Analysen dienen sollten, die mit Antikörpern gegen das T7- und His-Epitop durchgeführt wurden. Für die Produktion von PC1C wurde dessen C-terminaler Aminosäurebereich von Position 4190-4302 herangezogen (pET21b/PKD1C), da dieser Bereich nach Immunpräzipitationsstudien von Tsiokas et al. (1997) bzw. Qian et al. (1997) zufolge ausreichend ist, um mit PC2C zu interagieren. Der genannte Aminosäurebereich

enthält die als Interaktionsdomäne postulierte Coiled-coil-Struktur. Im Falle von PIGEA-14 wurde die gesamte Aminosäuresequenz (pET21b/PIGEA-14) produziert, da noch keine Immunpräzipitationsdaten von verkürzten Versionen des Proteins vorlagen. Für das als Negativ-Kontrolle fungierende CLIM1-Protein wurde die für den Aminosäurebereich 266-373 kodierende cDNA-Sequenz ebenfalls so in pET21b inkloniert, dass CLIM1 mit einem N-terminalen T7-Epitop und einem C-terminalen His-Epitop exprimiert wurde (pET21b/CLIM1). Da die Aufreinigung von weiteren Polycystin-2 Bindepartnern geplant war, die nahezu den gesamten C-terminalen Bereich von PC2 abdecken (vgl. 1.6), wurde für die Aufreinigung des C-Terminus von Polycystin-2 der Aminosäurebereich 680-968 herangezogen, wobei dieser am N-Terminus mit MBP fusioniert wurde (ein GST-Fusionsprotein von PC2C wurde bereits im Bakterium degradiert, Daten nicht gezeigt), der über die sog. HRV 3C-Protease abspaltbar war (pMAL-c2/PKD2C).

A. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET21b/PKD1C

Da die kodierende Sequenz für den C-Terminus von Polycystin-1 in einen pET21-Vektor kloniert wurde, der einen sog. T7-Promotor enthält, wurden für die Proteinexpression Bakterienstämme wie BL21 oder Rosetta (vgl. auch 2.1.9.A) herangezogen, da diese eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase-Sequenz besitzen. Bei Induktionskinetiken (vgl. auch 2.2.1.E) zeigte sich, dass das Fusionsprotein am besten im BL21(DE3)-Stamm produziert wird (Kapzan, 2006). Weiterhin ergab sich, dass mit einer 4-stündigen Induktion bei 37°C bis zu 3,6 mg Protein pro Liter LB-Kultur gewonnen werden konnten. Die Induktion sollte dabei bei Erreichen eines OD-Wertes von 1 gestartet werden. In Abbildung 36 sind 5 µg des Proteinproduktes von pET21b/PKD1C nach Elution von der Nickel-Säule zu sehen, wobei die Elution mit Imidazol erfolgte (s. auch 2.2.4.E).

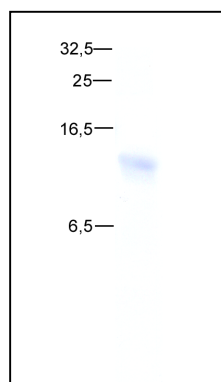


Abb. 36: Proteinprodukt von pET21b/PKD1C nach Elution von der Nickel-Säule. Transformierte (2.2.1.D) BL21(DE3)-Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert (vgl. auch 2.2.1.E) und das Lysat auf eine Nickel-Säule aufgetragen (vgl. auch 2.2.4.E). Nach der Elution mit Imidazol wurden die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereinigt und 5 µg Protein auf ein 18%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (vgl. auch 2.2.4.B und C). **Das Proteinprodukt von pET21b/PKD1C läuft auf der erwarteten Molekulargewichtshöhe und ist frei von Kontaminationen.**

Aus Abbildung 36 ist zu ersehen, dass das rekombinant produzierte PC1C „sauber“ und in der erwarteten Molekulargewichtsgröße von ungefähr 14,6 kDa von der Nickel-Säule eluiert. Western-Blot-Analysen mit einem anti-T7-Epitop-Antikörper bzw. einem anti-His-Antikörper bestätigten, dass es sich bei dem in Abbildung 36 gezeigten Protein um das vollständige Translationsprodukt von pET21b/PKD1C handelt (Daten nicht gezeigt). Nach der Elution von der Nickel-Säule mittels Imidazol musste letzteres aus der Proteinlösung entfernt werden, um eine Bindung des Proteinproduktes von pET21b/PKD1C an die Quarzmikrowaage zu gewährleisten. Hierzu wurde das eluierte Protein gegen 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl (Elutionspuffer ohne Imidazol) dialysiert. In diesem Puffer war das Fusionsprotein in einer Konzentration von 0,07 µg/µl (Bradford-Wert) auf Eis über mehrere Wochen stabil. Dies entspricht einer Molarität von 4,7 µM. Es zeigte sich, dass die Neigung von PC1C zur Präzipitation während der Dialyse deutlich herabgesetzt wird, wenn dieses zunächst gegen einen Imidazol- und EDTA-haltigen Elutionspuffer dialysiert wird, wobei im nächsten Schritt zunächst Imidazol und daraufhin EDTA aus dem Dialysepuffer entfernt werden (vgl. auch 2.2.4.G).

B. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET21b/PIGEA-14

Wie bei pET21b/PKD1C (vgl. auch 3.3.2.A) kamen auch für dieses Konstrukt nur Bakterienstämme wie Rosetta oder BL21 für die Expression in Frage. Im Rahmen von Induktionskinetiken zeigte sich, dass der BL21(DE3)-Stamm am besten für die Gewinnung von rekombinantem PIGEA-14 geeignet ist. So konnten aus einem Liter LB-Kultur in einem Induktionszeitraum (Induktionsstart bei OD 0,5) von 4 Stunden bei einer Temperatur von 30°C ungf. 670 µg Protein gewonnen werden. Um ein Denaturieren des Fusionsproteins bei nachfolgenden Dialyseschritten zu verhindern, wurde dieses allerdings nicht wie üblich mit Imidazol, sondern mit EDTA eluiert (vgl. auch 2.2.4.E). Unter Abbildung 37 sind 4 µg des Proteinproduktes von pET21b/PIGEA-14 nach der Elution von der Nickel-Säule zu sehen (s. auch 2.2.4.E).

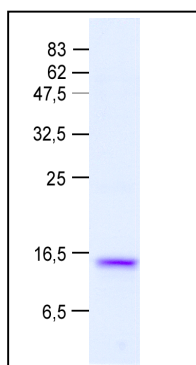


Abb. 37: Proteinprodukt von pET21b/PIGEA-14 nach der Elution von der Nickel-Säule. Transformierte (2.2.1.D) BL21(DE3)-Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert (vgl. auch 2.2.1.E) und das Lysat auf eine Nickel-Säule aufgetragen (vgl. auch 2.2.4.E). Nach der Elution mit EDTA wurden die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereinigt und 4 µg Protein auf ein 13%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (vgl. auch 2.2.4.B und C). **Das Proteinprodukt von pET21b/PIGEA-14 läuft ungefähr auf der erwarteten Molekulargewichtshöhe und ist frei von Kontaminationen.**

Abbildung 37 ist zu entnehmen, dass PIGEA-14 kontaminationsfrei von der Säule eluiert und etwas unterhalb der errechneten Molekulargewichtshöhe von $\sim 17,2$ kDa läuft. Eine Western-Blot-Analyse mit einem anti-T7-Epitop-, anti-PIGEA-14- bzw. anti-His-Antikörper zeigte jedoch, dass es sich bei dem Protein in Abbildung 37 um das vollständig translatierte Proteinprodukt von pET21b/PIGEA-14 handelt (Daten nicht gezeigt). Nach der Elution musste das EDTA entfernt werden, da dies mit der Immobilisierung von pET21b/PIGEA-14 an der Quarzmikrowaage interferieren würde. Daher wurde der Eluatpool in 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl (Elutionspuffer ohne EDTA) umdialysiert, wobei das PIGEA-14-Fusionsprotein in diesem Puffer in einer Konzentration von $0,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Bradford-Wert) auf Eis über mehrere Wochen stabil war, was einer Molarität von $3,4 \mu\text{M}$ gleichkommt.

C. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET21b/CLIM1

Im Falle des als Negativ-Kontrolle fungierenden CLIM1-Proteins wurde das verwendete Expressionskonstrukt durch Jürgen Prestel (diese Arbeitsgruppe) bereitgestellt. Der Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS erwies sich am geeignetsten für die Produktion des Kontrollproteins. Induktionskinetiken ergaben, dass mit einer 4-stündigen Induktion bei 30°C (Induktionsstartpunkt bei OD 0,5) aus 5 Liter LB-Kultur nur ungefähr $870 \mu\text{g}$ Protein gewonnen werden können. Die Elution erfolgte mit Imidazol. Unter Abbildung 38 sind $6,6 \mu\text{g}$ des Proteinproduktes von pET21b/CLIM1 nach Elution von der Nickel-Säule zu sehen.

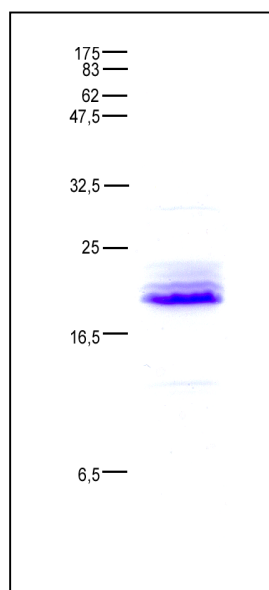


Abb. 38: Proteinprodukt von pET21b/CLIM1 nach Elution von der Nickel-Säule. Transformierte (2.2.1.D) BL21(DE3)-Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert (vgl. auch 2.2.1.E) und das Lysat auf eine Nickel-Säule aufgetragen (vgl. auch 2.2.4.E). Nach der Elution wurden die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereint und $6,6 \mu\text{g}$ Protein auf ein 18%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (s. auch 2.2.4.B und C). **Das Proteinprodukt von pET21b/CLIM1 läuft über der erwarteten Molekulargewichtshöhe.**

In Abbildung 38 ist zu sehen, dass das Kontrollprotein CLIM1 ein deutlich höheres Molekulargewicht zeigt, als nach den Datenbankberechnungen (~ 14 kDa) zu erwarten wäre.

Eine Western-Blot-Analyse mit einem anti-T7-Epitop und anti-His-Antikörper (ein Antikörper gegen CLIM1 lag nicht vor) zeigte jedoch, dass das aufgereinigte Protein nur durch den anti-T7-Epitop Antikörper erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Als Ersatz-Kontrollprotein wurde daher von der Kooperationsgruppe ein anderes Kontrollprotein bereitgestellt, bei dem es sich um Ezrin handelt, das am N-Terminus ein His-Epitop trug (~70 kDa). Ezrin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, das unter anderem als Membran-Zytoskelett-Linker fungiert (Dransfield et al., 1997).

D. Aufreinigung des Proteinproduktes von pMAL-c2/PKD2C

Da der pMAL-c2-Vektor einen *tac*-Promotor enthält, standen für die Expression von pMAL-c2/PKD2C neben dem DH5 α -Stamm auch Stämme wie BL21 bzw. Rosetta zur Verfügung. Im Rahmen von Induktionskinetiken ergab sich, dass das Protein am besten in Rosetta(DE3)pLysS produziert wird. So können bei einer 4-stündigen Induktion bei 37°C bis zu 60 mg Protein pro Liter LB-Kultur erzielt werden, wenn bei einer optischen Dichte von 0.5 induziert wird. In Abbildung 39 sind 5 μ g des Proteinproduktes von pMAL-c2/PKD2C nach der Elution von der Amylose-Säule gezeigt, wobei die Elution mit Maltose erfolgte (vgl. auch 2.2.4.F).

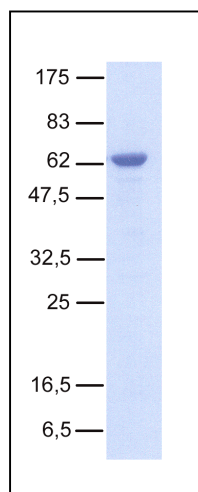


Abb. 39: Proteinprodukt von pMAL-c2/PKD2C-Probe nach der Elution von der Amylose-Säule. Transformierte (s. auch 2.2.1.D) Rosetta(DE3)pLysS-Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert (vgl. auch 2.2.1.E) und das Lysat auf eine Amylose-Säule aufgetragen (vgl. auch 2.2.4.F). Nach der Elution mit Maltose wurden die Protein-haltigen Eluatfraktionen vereinigt und 5 μ g Protein auf ein 11%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (vgl. auch 2.2.4.B und C). **Das Proteinprodukt von pMAL-c2/PKD2C läuft auf der erwarteten Molekulargewichtshöhe und ist frei von Kontaminationen.**

Es ist zu erkennen, dass das MBP-Fusionsprotein sauber und in der erwarteten Molekulargewichtshöhe (~76,8 kDa) von der Amylose-Säule eluiert (vgl. Abb. 39). Eine Western-Blot-Analyse mit einem gegen den C-Terminus von Polycystin-2 gerichteten Antikörper (YCC2: AS 687-962; siehe auch 2.1.7.A) bestätigte, dass es sich bei dem in Abbildung 39 gezeigten Protein um das vollständig synthetisierte Proteinprodukt von pMAL-c2/PKD2C handelt (Daten nicht gezeigt). Um jedoch weitere Kontrollmessungen in Form des

reinen MBPs an der Quarzmikrowaage zu vermeiden, wurde beschlossen, MBP mittels der His-fusionierten Endoprotease HRV 3C zu entfernen. Da nach einer Abspaltung von MBP in Lösung keine zufriedenstellende Trennung von MBP und dem C-Terminus von PC2 zu erreichen war (Daten nicht gezeigt), wurde die Spaltreaktion auf der Amylose-Säule durchgeführt (vgl. auch 2.2.4.I). Das im Durchfluss befindliche C-terminale Fragment wurde nach dem Verdau über eine Nickel-Säule gegeben, um die His-fusionierte Protease zu entfernen. Es zeigte sich jedoch, dass ein großer Anteil des C-Terminus von PC2 (~70%) ebenfalls mit den Nickel-Ionen in Wechselwirkung trat. Durch Verwendung von Imidazol in Konzentrationen von 30 bzw. 60 mM konnte PC2C allerdings von der Säule eluiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Western-Blot-Analyse mit einem anti-His-Antikörper zeigte, dass keinerlei Protease-Kontaminationen in den Fraktionen enthalten waren, da die Protease (~22 kDa) erst bei 1 M Imidazol von der Säule eluierte (Daten nicht gezeigt; vgl. auch 2.2.4.I). Ein weiterer Aufreinigungsschritt der nach Elution mit Imidazol erhaltenen Fraktionen von PC2C (Durchfluss wurde verworfen, da hauptsächlich MBP enthalten ist) über eine Amylose-Säule sollte zur Abtrennung einer trotz Säulenspaltung unvermeidlichen (leichten) MBP-Kontamination dienen. Im Anschluss wurde die Probe zum Entfernen des Imidazols gegen 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl dialysiert. In diesem Puffer war das Protein in einer Konzentration von 1,2 µg/µl (Bradford-Wert), also einer Molarität von etwa 36,5 µM, auf Eis über mehrere Wochen stabil. In Abbildung 40 ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel gezeigt, auf das 3 µg des C-terminalen Fragmentes von PC2 nach der Abspaltung von MBP (vor dem Dialyseschritt) aufgetragen wurden.

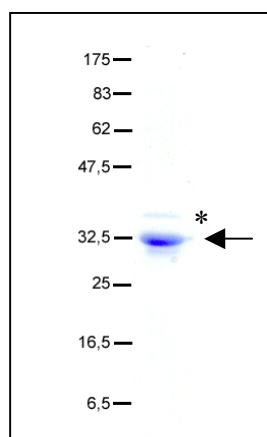


Abb. 40: C-Terminus von PC2 (PC2C) nach dem Verdau des Proteinproduktes von pMAL-c2/PKD2C mit HRV 3C. Das Proteinprodukt von pMAL-c2/PKD2C wurde auf der Amylose-Säule einer Spaltreaktion mit der His-fusionierten HRV 3C-Protease unterzogen. Zur Abtrennung der Protease wurde der Verdau über eine Nickel-Säule gegeben, wobei PC2C mit Imidazol von der Säule eluiert werden musste. Die Imidazol-Fractionen von PC2C wurden anschließend vereinigt und über eine Amylose-Säule gegeben, um MBP abzutrennen. Dann wurden 3 µg Protein aus dem Durchfluss auf ein 11%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das mit Coomassie gefärbt wurde (2.2.4.B und C). **Das MBP-freie PC2C-Peptid (siehe Pfeil) hat die erwartete Molekulargewichtsgröße und zeigt eine leichte MBP-Kontamination (siehe Stern).**

Aus Abbildung 40 ist zu ersehen, dass der C-Terminus von PC2 (PC2C) nach Entfernen von MBP auf der nach den Datenbankberechnungen zu erwartenden Molekulargewichtshöhe von ~32,8 kDa (siehe Pfeil) läuft. Die Spaltung des Proteins war vollständig, da keine Bande auf Höhe des ungespaltenen Proteins (~76,8 kDa) zu erkennen ist (Amylose-Bead Proben vor

und nach dem Verdau zeigten im Coomassie-Gel ebenfalls einen vollständigen Verdau an). Die schwache Bande (siehe Stern in Abb. 40) oberhalb von PC2C stellt eine Verunreinigung durch MBP (~34 kDa) dar, die sich trotz des letzten Reinigungsschrittes der Proteinlösung über eine Amylose-Säule nicht vollständig beseitigen ließ. Angesichts der vergleichsweise schwachen Bandenintensität ist diese Kontamination jedoch vernachlässigbar gering.

3.3.3 Quarzmikrowaage-Messungen (durchgeführt von Sabine Bosk, vgl. auch Bosk, 2007)

Im Hinblick auf die Interpretation der mittels Quarzmikrowaage ermittelten Messdaten lag ein besonderes Augenmerk der Diplomarbeit von Sabine Bosk (Bosk, 2007: durchgeführt am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen) auf der Ermittlung eines experimentellen Assays, der bezüglich der Salzkonzentrationen bzw. des pH-Wertes physiologischen Bedingungen gleichkam. Daher wurden sämtliche Messungen in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl durchgeführt. Ein Salzgehalt von 150 mM KCl spiegelt in etwa die Werte der intrazellulären Elektrolytkonzentrationen (Schmidt und Thews, 1997) wider. Ein pH-Wert von 8,0 stellt hingegen eine Art Kompromiss dar, da His-fusionierte Proteine bei pH-Werten um pH 7,0 zum Teil nicht mehr ganz so effizient an Nickel-Ionen binden wie bei pH 8,0 (Amersham Biosciences, 2005). Für die in Göttingen durchgeführten Versuche (Bosk, 2007) wurde der C-Terminus von PC2 mittels Ultrafiltrationsröhrchen umgepuffert, wohingegen die Bindungspartner zunächst im Originalpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl) am Messsystem immobilisiert wurden und dann durch ausgiebiges Spülen des Systems mit der genannten Lösung umgepuffert wurden. Die Messungen fanden bei 20°C an einem QCM 200-Gerät der Firma Stanford Research Systems, Inc., Sunnyvale (USA) statt (Bosk, 2007).

Da sich bei der Aufreinigung des C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) zeigte, dass dieser mit Nickel-Ionen in Wechselwirkung treten kann (vgl. auch 3.3.2.D), sollte zunächst überprüft werden, inwiefern sich dieser Effekt auf das Meßsystem auswirkt. Hierzu wurde der C-Terminus von Polycystin-2 (0,019 µM) auf die Quarzmikrowaage mit einer Modellmembran aus DOPC/DOGS-NTA-Ni gegeben und die zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes gemessen (vgl. auch Abb. 41).

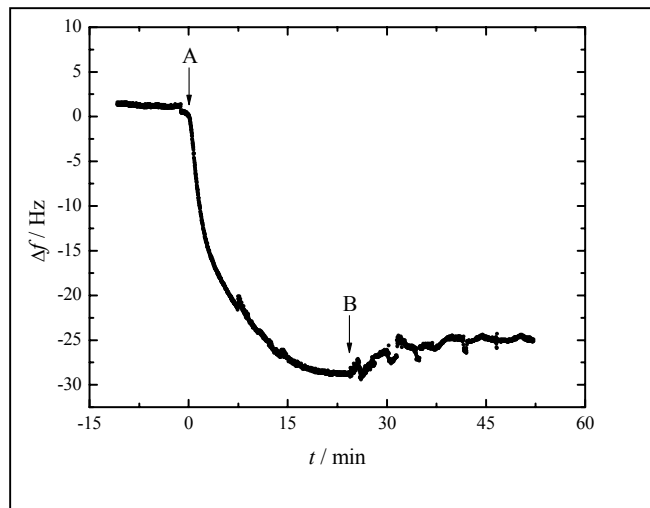


Abb. 41: Zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz eines 5 MHz AT-cut Quarzes nach Zugabe des C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) [Bosk, 2007]. Pfeil A: Zeitpunkt der Zugabe von 0,019 μ M PC2C (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl) auf einen 5 MHz AT-cut Quarz, funktionalisiert mit einer DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1)-Doppelschicht. Pfeil B: Beginn des Spülvorganges mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl. PC2C kann mit der Membran wechselwirken.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von 0,019 μ M PC2C zum Meßsystem ein Absinken der Resonanzfrequenz um \sim 28 Hz zur Folge hat, was bedeutet, dass PC2C in nicht unerheblichem Maße mit der Membran wechselwirkt. Weitere Untersuchungen mit einer OT-DOPC-Doppelschicht (enthielt keine Nickel-Ionen) bestätigten, dass die Wechselwirkung von PC2C mit der Membran ausschließlich durch die Affinität zu den Nickel-Ionen und nicht durch Interaktionen mit den Lipiden zu erklären ist (Bosk, 2007). Daher wurde zunächst versucht, die Wechselwirkung von PC2C mit der Membran durch Zugabe von Imidazol zu verhindern. Hierzu wurden gleiche Konzentrationen von PC2C in Anwesenheit von verschiedenen Imidazolkonzentrationen (100, 50 und 0 mM) auf die Quarzmikrowaage gegeben und die zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz festgehalten (vgl. Abb. 42).

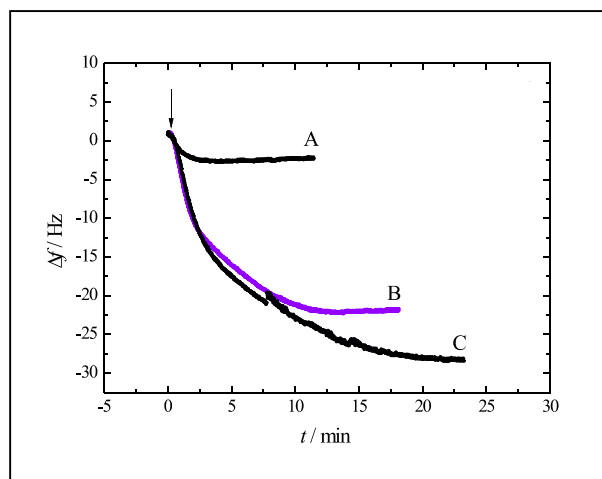


Abb. 42: Zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz eines 5 MHz AT-cut Quarzes nach Zugabe des C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen (Bosk, 2007). Pfeil: Zugabe von gleichen PC2C-Konzentrationen (0,019 μ M in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl) auf einen 5 MHz AT-cut Quarz, funktionalisiert mit einer DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1)-Doppelschicht bei Anwesenheit von: **A**: 100 mM Imidazol in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl; **B** : 50 mM Imidazol in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl; **C**: 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl. Für eine übersichtlichere Darstellung der Kurvenverläufe ist die Kurve für **B** violett dargestellt. **Steigende Imidazolkonzentrationen verhindern die Wechselwirkung von PC2C mit der Membran.**

Aus Abbildung 42 ist zu ersehen, dass mit ansteigender Imidazolkonzentration der Abfall der Resonanzfrequenz deutlich geringer ausfällt. So beträgt die Resonanzfrequenzänderung in Anwesenheit von 100 mM Imidazol nur ungefähr 3 Hz anstelle der 28 Hz, die bei Imidazol-freiem Puffer beobachtet werden. Dies entspricht ungefähr noch 10% der bei Imidazol-freier Messung detektierten Massenabscheidung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass mit Imidazolkonzentration über 100 mM die Affinität von PC2C zur Membran komplett unterdrückt werden könnte. Parallel durchgeführte Studien, mit denen das Bindungsverhalten von PC1C (zu messender Bindungspartner von PC2C) in Gegenwart von Imidazol untersucht werden sollte, ergaben jedoch, dass PC1C bereits bei Imidazol-Konzentrationen um 50 mM kaum noch an die Membran bindet (vgl. auch Bosk, 2007). Daher musste dieser Ansatz verworfen werden. Eine weitere Möglichkeit, die Wechselwirkung von PC2C mit der Membran zu verhindern bestand darin, die Membran mit dem jeweiligen Bindungspartner vollständig zu belegen, bevor PC2C auf die Quarzmikrowaage gegeben wird. Um zu testen, ob dieser Ansatz durchführbar ist, wurde untersucht, ob die Zugabe von PC2C noch zu einer Resonanzfrequenzabsenkung führt, wenn die Membran zuvor mit dem His-fusionierten Ezrin (vgl. auch 3.3.2.C) abgesättigt wurde. Der Versuch ist in Abbildung 43 dokumentiert.

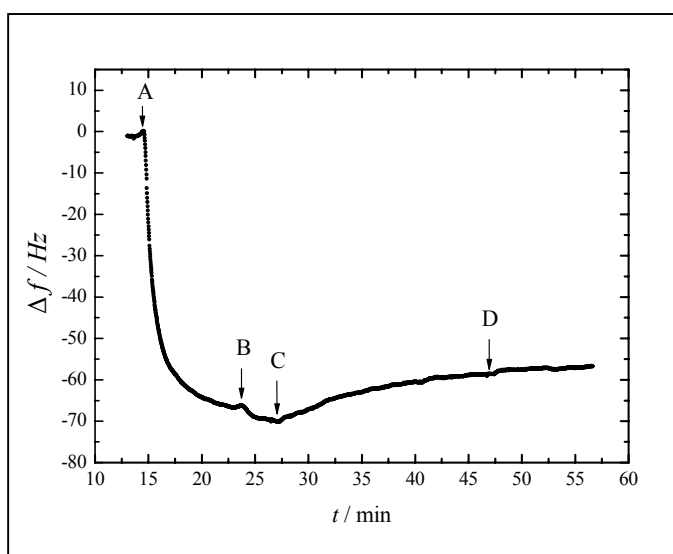


Abb. 43: Zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz eines 5 MHz AT-cut Quarzes nach Zugabe des C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) zu einer mit Ezrin abgesättigten Membran (Bosk, 2007). Die OT-DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1)-Doppelschicht eines 5 MHz AT-cut Quarzes wurde mit His-

fusioniertem Ezrin abgesättigt (siehe Pfeil A + B): **Pfeil A**: Zeitpunkt der Zugabe von 0,90 μM His-fusioniertem Ezrin (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl); **Pfeil B**: Zeitpunkt der Zugabe von 1,42 μM His-fusioniertem Ezrin (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl); **Pfeil C**: Beginn des Spülvorganges mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl; **Pfeil D**: Zugabe von 0,016 μM PC2C (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl) **Nach Absättigung der Membran mit Ezrin kann durch Zugabe von PC2C kein Absinken der Resonanzfrequenz beobachtet werden.**

Nach Zugabe von 0,9 μM Ezrin kommt es zu einer Frequenzabsenkung von ungefähr 65 Hz, die durch eine Zugabe von 1,42 μM Ezrin nur noch minimal gesteigert wird, so dass man davon ausgehen kann, dass die Membran vollständig mit Ezrin gesättigt ist. Die nach dem Spülvorgang zu beobachtende Frequenzerhöhung ist durch das Entfernen von ungebundenem Ezrin zu erklären. Da nach Zugabe von PC2C keine Absenkung der Resonanzfrequenz auftritt, kann man schlussfolgern, dass bei einer vollständigen Belegung der Membran mit den zu untersuchenden Bindungspartnern von Polycystin-2 keinerlei Wechselwirkungen von PC2C mit der Nickel-Membran mehr stattfinden können, die die Messergebnisse verfälschen würden.

A. Interaktion zwischen dem C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) und dem C-terminalen Fragment von Polycystin-1 (PC1C)

Zunächst wurde diejenige Konzentration von PC1C ermittelt, die notwendig ist, um die Membranoberfläche abzusättigen. So ergaben Vorversuche, dass im ersten Schritt ungefähr 0,44 μM des Fusionsproteins vorgelegt werden sollten, wobei nach Einpendeln der Resonanzfrequenz die Proteinkonzentration so lange weiter erhöht wurde, bis keine signifikante Absenkung der Frequenz mehr zu beobachten war. War dieser Punkt erreicht, konnte davon ausgegangen werden, dass die Membranoberfläche vollständig mit PC1C belegt war. In der Regel ging eine vollständige Absättigung der Membran mit einer Resonanzfrequenzänderung von ca. 70 ± 18 Hz einher. Beim Spülen des Systems mit dem Originalpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl) zum Entfernen von ungebundenem bzw. unspezifisch gebundenem Protein war eine leichte Frequenzerhöhung um etwa 4 ± 1 Hz zu dokumentieren (Bosk, 2007).

Um den K_d -Wert für die Interaktion zwischen PC1C und PC2C zu ermitteln, wurde die Membran auf dem Schwingquarz zunächst mit PC1C abgesättigt (vgl. Abb. 44). Hierzu wurde PC1C in den Konzentrationen 0,44 μM (Pfeil A), 0,63 μM (Pfeil B) und 0,72 μM (Pfeil C) eingesetzt. Bei Erreichen einer Frequenz von etwa 73 Hz änderte sich diese nicht mehr, so dass die Membran mit PC1C abgesättigt war. Zum Entfernen von ungebundenem Protein wurde zunächst mit dem Hochsalzpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl)

gespült (Pfeil D), was mit einer leichten Frequenzerhöhung einherging. Danach wurden die immobilisierten Proteine durch Spülen mit dem Niedrigsalzpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl) umgepuffert (Pfeil E). Der zu beobachtende Frequenzabfall ist auf Änderungen in der elektrochemischen Lipiddoppelschicht auf Grund der veränderten Salzkonzentrationen zurückzuführen. Nach Einpendeln der Resonanzfrequenz wurden dann 0,04 μM PC2C zugegeben (Pfeil F). Infolge der Interaktion zwischen beiden Proteinen kommt es zu einer weiteren Frequenzabsenkung um ~ 20 Hz (vgl. Abb. 44).

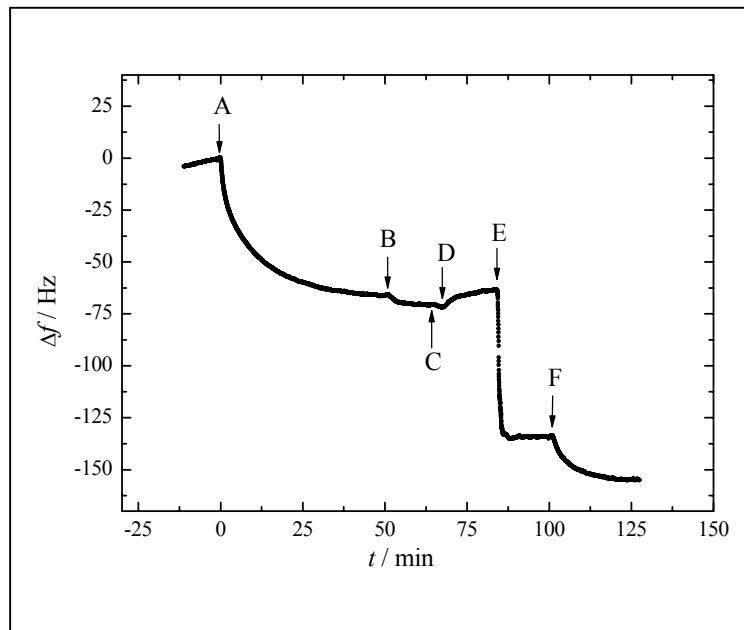


Abb. 44: Zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz eines 5 MHz AT-cut Quarzes nach Zugabe des C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) zu einer mit PC1C abgesättigten Membran (Bosk, 2007). Die OT-DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1)-Doppelschicht eines 5 MHz AT-cut Quarzes wurde mit PC1C abgesättigt mit (siehe Pfeil A-C): **Pfeil A:** 0,44 μM PC1C (in 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl); **Pfeil B:** 0,63 μM PC1C (in 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl); **Pfeil C:** 0,72 μM PC1C (in 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl). **Pfeil D:** Beginn des Spülvorganges mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl. **Pfeil E:** Beginn des Spülvorganges mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl. **Pfeil F:** Zugabe von 0,04 μM PC2C (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0/150 mM KCl). **Durch die Interaktion von PC2C mit PC1C wird ein Absinken der Resonanzfrequenz induziert.**

Weitere Kontrollexperimente zeigten, dass bei der Wechselwirkung von PC2C mit PC1C keinerlei viskoelastische Effekte auftraten, so dass die adsorbierte Schicht als homogene und rigide Monoschicht bezeichnet werden kann (Bosk, 2007). So änderte sich bei Zugabe von PC2C nur die Resonanzfrequenz Δf , nicht jedoch der Widerstand R (Daten nicht gezeigt). Außerdem war die Interaktion der beiden Proteine vollkommen reversibel (Bosk, 2007). Wird nach erfolgter PC2C Adsorption ein Spülvorgang mit reinem Puffer eingeleitet, so erreicht die Resonanzfrequenz wieder den Ausgangswert vor Zugabe von PC2C (vgl. Bosk, 2007). Somit erfüllte die Interaktion zwischen PC2C und PC1C die Bedingungen für eine Anpassung der

sog. Langmuir-Isotherme an die Adsorptionsisotherme von PC2C und PC1C, die man durch Auftragung von Δf_e gegen die verwendeten PC2C-Konzentrationen c erhält (vgl. Abb. 45).

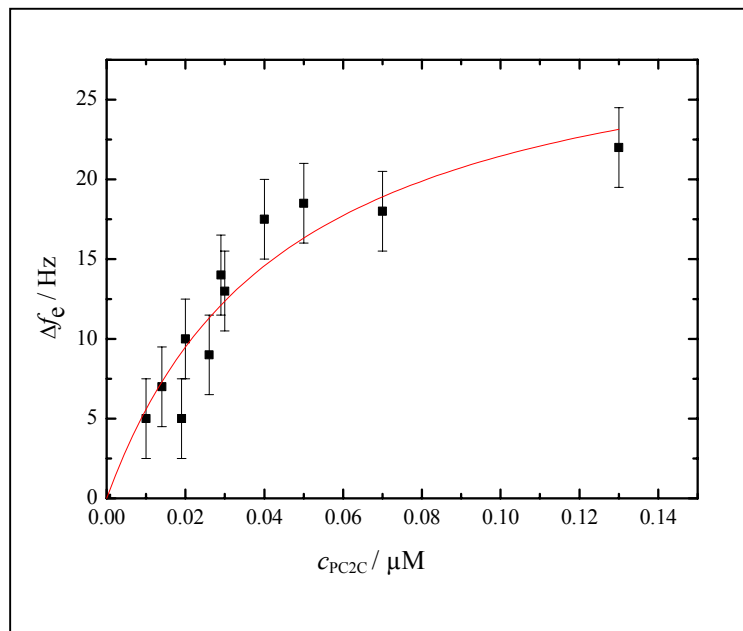


Abb. 45: Adsorptionsisotherme der Wechselwirkung zwischen PC2C und PC1C (Bosk, 2007). Die OT-DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1)-Doppelschicht eines 5 MHz AT-cut Quarzes wurde mit His-fusioniertem PC1C abgesättigt. Danach wurde PC2C zum System gegeben. Anschließend wurde die nach Zugabe von PC2C gemessene Änderung der Resonanzfrequenz Δf_e gegen die zugegebene Proteinkonzentration c aufgetragen. Durch Anpassung der Langmuir-Isotherme an die Datenpunkte (rote durchgezogene Linie) wurden die Werte für Δf_{max} und K_d ermittelt. **Der ermittelte K_d -Wert betrug 46 ± 13 nM.**

Durch Anpassung der Langmuir-Isotherme konnten als Wert für Δf_{max} (max. Frequenzänderung nach Absättigung aller mögl. Bindestellen) 31 ± 4 Hz und als Wert für K_d (Dissoziationskonstante) 46 ± 13 nM ermittelt werden (Abb. 45; vgl. auch 2.2.4.K). Die Bestimmung der Fehlerbalken erfolgte durch die Mittelung der Ergebnisse mehrerer Messungen, die unter Verwendung identischer Protein-Konzentrationen durchgeführt wurden. Die Abweichung vom Mittelwert als maximaler Fehler wurde an alle anderen Messpunkte angelegt (Bosk, 2007).

Durch Auftragung der konzentrationsabhängigen Ratenkonstante k_s als Funktion der zugegebenen Ligandkonzentration c können die k_{on} - bzw. k_{off} -Raten einer Protein-Protein-Wechselwirkung ermittelt werden (vgl. 2.2.4.K). Zur Ermittlung der Ratenkonstante k_s muss eine monoexponentielle Funktion an die zeitliche Änderung der Frequenz (bei Zugabe des Bindungspartners) angepasst werden. Auf diese Weise ergab sich ein Wert von $(3,44 \pm 0,01) * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Im Rahmen des Kooperationsprojektes konnten jedoch nicht genügend Datenpunkte gesammelt werden, um verlässliche k_{on} - bzw. k_{off} -Werte zu erhalten.

B. Interaktion zwischen dem C-Terminus von Polycystin-2 (PC2C) und PIGEA-14

Auch hier wurde zunächst diejenige Konzentration von PIGEA-14 ermittelt, die notwendig ist, um die Membranoberfläche abzusättigen. So ergaben Vorversuche, dass im ersten Schritt ungefähr $0,40 \mu\text{M}$ des Fusionsproteins vorgelegt werden sollten, wobei nach Einpendeln der Resonanzfrequenz die Proteinkonzentration so lange weiter erhöht wurde, bis keine signifikante Absenkung der Frequenz mehr zu beobachten war. War dieser Punkt erreicht, konnte davon ausgegangen werden, dass die Membranoberfläche vollständig mit PIGEA-14 belegt war. In der Regel ging eine vollständige Absättigung der Membran mit einer Resonanzfrequenzänderung von $\sim 82 \pm 32 \text{ Hz}$ einher. Beim Spülen des Systems mit dem Originalpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl) zum Entfernen von ungebundenem bzw. unspezifisch gebundenem Protein war eine leichte Frequenzerhöhung um etwa $6 \pm 2,5 \text{ Hz}$ zu dokumentieren (Bosk, 2007).

Für die Ermittlung des K_d -Wertes der Interaktion zwischen PC2C und PIGEA-14 wurde wie bei der Studie für die Wechselwirkung zwischen PC2C und PC1C (unter 3.3.3.A beschrieben) vorgegangen. Durch Auftragung der Differenz der Resonanzfrequenz Δf_e als Funktion der zugegebenen PC2C-Konzentration c wurde die unter Abbildung 46 gezeigte Adsorptionsisotherme erhalten.

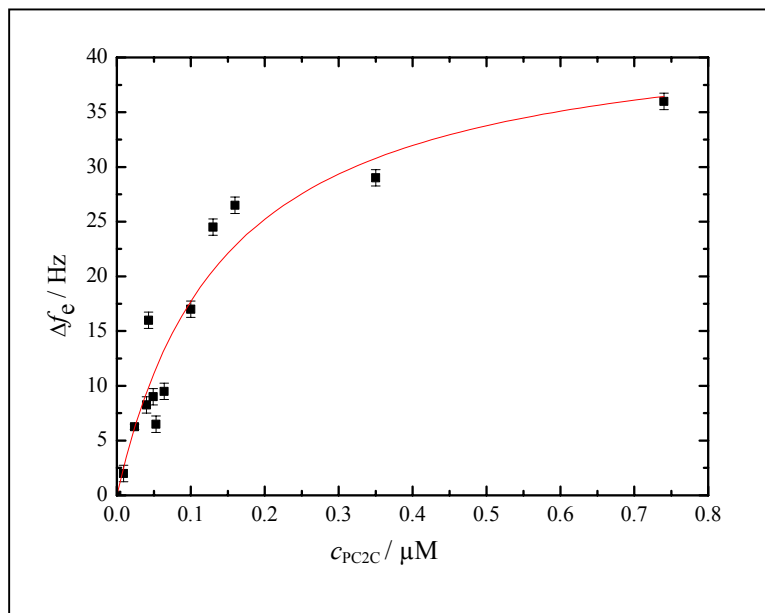


Abb. 46: Adsorptionsisotherme der Wechselwirkung zwischen PC2C und PIGEA-14 (Bosk, 2007). Die OT-DOPC/DOGS-NTA-Ni (9:1)-Doppelschicht eines 5 MHz AT-cut Quarzes wurde mit His-fusioniertem PIGEA-14 abgesättigt. Danach wurde PC2C zum System gegeben. Anschließend wurde die nach Zugabe von PC2C gemessene Änderung der Resonanzfrequenz Δf_e gegen die zugegebene Proteinkonzentration

c aufgetragen. Durch Anpassung der Langmuir-Isotherme an die Datenpunkte (rote durchgezogene Linie) wurden die Werte für Δf_{\max} und K_d ermittelt. **Der ermittelte K_d -Wert betrug 146 ± 35 nM.**

Indem eine Langmuir-Isotherme an die Datenpunkte der Adsorptionsisotherme angepasst wurde, konnte ein Wert von 44 ± 5 Hz für Δf_{\max} und ein Wert von 146 ± 35 nM für die Dissoziationskonstante ermittelt werden (Abb. 46). Die Bestimmung der Fehlerbalken erfolgte durch die Mittelung der Ergebnisse mehrerer Messungen, die unter Verwendung identischer Protein-Konzentrationen durchgeführt wurden. Die Abweichung vom Mittelwert als maximaler Fehler wurde an alle anderen Messpunkte angelegt. Es zeigte sich, dass während der Bindung von PC2C an PIGEA-14 keinerlei viskoelastische Effekte auftraten (Bosk, 2007). Daher kann angenommen werden, dass die adsorbierte Schicht als homogene und rigide Monoschicht bezeichnet werden kann. Im Bezug auf das Desorptionsverhalten von PC2C wurden jedoch sehr unterschiedliche Beobachtungen gemacht. So wurden neben einer vollständigen Desorption (100%) auch Desorptionen von nur etwa 10% dokumentiert. Daher sollte der mittels Langmuir-Isotherme ermittelte K_d -Wert unter Vorbehalt diskutiert werden (Bosk, 2007).

Nachdem eine Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die zeitliche Änderung der Frequenz (bei Zugabe des Interaktionspartners) vorgenommen wurde (2.2.4.K), konnte als Wert für die konzentrationsabhängige Ratenkonstante k_s ($1,35 \pm 0,01$) * 10^{-3} s⁻¹ ermittelt werden. Auch hier reichten die gesammelten Datenpunkte nicht aus, um verlässliche Werte für die k_{on} - bzw. k_{off} -Raten zu erhalten (vgl. Bosk, 2007).

3.4 Strukturelle Charakterisierung des C-Terminus von Polycystin-2 über NMR

Der C-Terminus von Polycystin-2 ist nicht nur in funktioneller, sondern auch in struktureller Hinsicht interessant (vgl. 1.3). So beinhaltet diese 289 Aminosäuren umfassende Domäne ein Signal-Motiv (AS 787-820), das für eine vornehmliche Lokalisierung von PC2 im ER (vgl. Abb. 47) verantwortlich ist (Cai et al., 1999). Diese Region zeichnet sich beispielsweise durch eine Anhäufung von sauren Aminosäureresten aus. Weiterhin ist eine sog. EF-Hand (vgl. Abb. 47) zu nennen, die sich Datenbankrecherchen zufolge über den Aminosäureabschnitt 754-782 erstreckt und aus einem Helix-Loop-Helix-Motiv zusammengesetzt ist (Mochizuki et al., 1996). Ein als Coiled-coil-Domäne (Abb. 47) bezeichneter Abschnitt ist im Bereich von Aminosäure 763-796 zu finden (Mochizuki et al., 1996). Außerdem interagieren 14 der 15 bisher identifizierten Bindungspartner von Polycystin-2 ausschließlich oder unter anderem

3.4.1 Proteinaufreinigungen für die NMR-Messungen

Ohne Deuterierung ist eine Strukturaufklärung über NMR für Proteine bis zu einer Molekulargewichtsgröße von 20-25 kDa ohne große Probleme möglich (pers. Mitteilung Dr. Frank Schumann). Da der gesamte C-terminale Abschnitt von Polycystin-2 mit ungefähr 32,5 kDa über dieser Obergrenze liegt, wurde entschieden, den zu untersuchenden Sequenzbereich zweizuteilen. So sollte zum einen ein C-terminales Fragment produziert werden, das den Aminosäureabschnitt 680-796 umfasst. Dieses Fragment enthielt den als Coiled-coil-Domäne und den als EF-Hand bezeichneten Sequenzabschnitt, da unter anderem Bindungsstudien mit Calcium geplant waren. Das zweite Fragment enthielt den Bereich von Aminosäure 797-968. Beide Proteine wurden mit einem N-terminalen His-Epitop produziert, das jeweils über eine Endoprotease wie Thrombin oder HRV 3C abspaltbar war (vgl. Abb. 48).

6x His	Thrombin-Spaltstelle	AS 680-796 von hPC2C	pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796): ~15,8 kDa
6x His	HRV 3C-Spaltstelle	AS 797-968 von hPC2C	pET47b/PKD2(797-968): ~21,5 kDa

Abb. 48: Schematische Darstellung der Konstrukte für die NMR-Messungen.

Da es bei einer Strukturaufklärung vor allem auf eine native Faltung des zu untersuchenden Proteins ankommt, wurde auch bei den Proteinaufreinigungen für die NMR-Analysen auf eine native Gewinnung der Proteine Wert gelegt. Da Triton X-100 in Konzentrationen von 0,1% und kleiner keinerlei störenden Einfluss auf die NMR-Messungen hat (pers. Mitteilung Dr. Frank Schumann), wurde dieses Detergens zur besseren Solubilisierung der Proteine während der Aufreinigung verwendet (vgl. auch 2.2.4.E). Um für spätere Analysezwecke Proteine mit ^{15}N , ^{13}C oder ^2H markieren zu können (notwendig für die Strukturaufklärung mittels 3D-NMR Techniken), wurden die jeweiligen Expressionsstämme entweder in M9- oder NMM-Minimalmedium kultiviert (siehe auch 2.2.1.E). Da Tris-haltige Puffer aufgrund der Amin-Reste möglicherweise NMR-Signale überlagern könnten, wurde entschieden, die Proteine in einem $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer zu messen. Dialysetests ergaben, dass die Proteine in den hohen Konzentrationen (~1 mM), die für die Analysen notwendig waren, erst bei einem leicht sauren pH von 6,8 und einem mit 500 mM NaCl recht hohen Salzgehalt in einem 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer stabil waren (Daten nicht gezeigt).

A. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796)

Da die für den Aminosäurebereich 680-796 von Polycystin-2 kodierende Sequenz in einen pET41-Vektor kloniert wurde, der einen sog. T7-Promotor enthält, wurden für die Proteinproduktion Bakterienstämme wie BL21 oder Rosetta (vgl. auch 2.1.9.A) herangezogen (diese besitzen eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase-Sequenz). Bei Induktionskinetiken (vgl. auch 2.2.1.E) zeigte sich, dass das Fusionsprotein am besten im BL21(DE3)-Stamm produziert wird. Weiterhin ergab sich, dass mit einer 4-stündigen Induktion bei 30°C bis zu 10 mg Protein pro Liter NMM-Kultur (2.2.1.E) gewonnen werden konnten, wenn bei einer optischen Dichte von 0,5 induziert wurde. In Abbildung 49 sind 5 µg des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) nach Elution von der Nickel-Säule (siehe auch 2.2.4.E) zu sehen (die Elution erfolgte mit Imidazol).

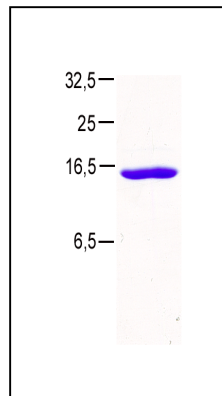


Abb. 49: Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) Elution von der Nickel-Säule. Transformierte (2.2.1.D) BL21(DE3)-Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert (vgl. auch 2.2.1.E) und das Lysat auf eine Nickel-Säule aufgetragen (vgl. auch 2.2.4.E). Nach der Elution wurden die Protein-haltigen Eluatfraktionen vereingt und 5 µg Protein auf ein 18%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (s. auch 2.2.4.B und C). **Das Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) läuft auf der berechneten Molekulargewichtshöhe und ist frei von Kontaminationen.**

Man kann erkennen, dass das rekombinante Protein kontaminationsfrei und in der erwarteten Molekulargewichtsgröße von ~15,8 kDa von der Säule eluierte (vgl. Abb. 49). NMR-Vorversuche mit dem His-fusionierten Protein gaben Anlass zu der Vermutung, dass eine Entfernung des His-Epitops die Anzahl an detektierbaren Aminosäuren steigern könnte, da dieser vermutlich bei Anwesenheit von zweiwertigen Kationen zur Aggregation des zu untersuchenden Peptides führt (Daten nicht gezeigt). Daher wurde beschlossen, die Histidine mittels der biotinylierten Endoprotease Thrombin abzuspalten. Hierzu wurde das Protein nach der Elution von der Nickel-Säule in Lösung einer Spaltreaktion mit Thrombin unterzogen (vgl. auch 2.2.4.I). Um die biotinylierte Protease (diese läuft in 18%igem SDS-Polyacrylamid-Gel zwischen 25 und 32,5 kDa; Daten nicht gezeigt) zu entfernen, wurde der Ansatz mit Streptavidin-Beads behandelt und danach zur Abtrennung des His-Epitops auf eine Nickel-Säule gegeben. Wie bereits bei der Spaltreaktion des Proteinproduktes von pMAL-c2/PKD2C trat auch hier ein großer Teil des C-terminalen Fragmentes (~90%) in Wechselwirkung mit den Nickel-Ionen (Daten nicht gezeigt). Durch Verwendung von 100

mM Imidazol konnte das PC2C-Fragment jedoch von der Säule eluiert werden. Im Anschluss wurden der Durchfluss und die Imidazolfraktionen vereinigt, gegen 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,8/500 mM NaCl dialysiert und mittels Ultrafiltration auf 0,5-0,8 mM (Bradford-Wert) ankonzentriert. In Abbildung 50 sind 5 μ g des His-freien Proteinproduktes von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) vor der Dialyse und der Ankonzentrierung auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel zu sehen, wobei zur besseren Veranschaulichung der His-Abspaltung zusätzlich 5 μ g an ungespaltenem Protein aufgetragen wurden (Abb. 50).

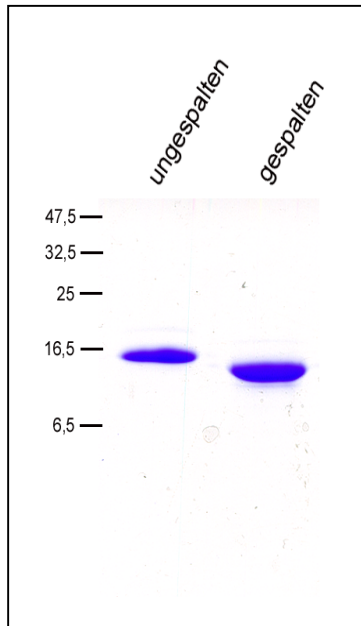


Abb. 50: C-terminales Fragment von PC2 (AS 680-796) nach dem Verdau des Proteinproduktes von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) mit Thrombin. Das Proteinprodukt von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) wurde in Lösung einer Spaltreaktion mit der biotinylierten Thrombin-Protease unterzogen. Zur Abtrennung der Protease und der Histidine wurde der Verdau zunächst mit Streptavidin-Beads behandelt und anschließend über eine Nickel-Säule gegeben, wobei PC2C mit Imidazol von der Säule eluiert werden musste. Der Durchfluss und die nach Elution mit Imidazol erhaltenen Fraktionen von PC2C wurden anschließend vereinigt. Dann wurden 5 μ g gespaltenes bzw. ungespaltenes Protein auf ein 18%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das mit Coomassie gefärbt wurde (2.2.4.B und C). **Das His-freie Proteinprodukt von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) hat die erwartete Molekulargewichtsgröße und ist frei von Kontaminationen.**

Man kann erkennen, dass die Bande für das His-freie Peptid - wie zu erwarten - etwas unterhalb derjenigen Bande für das ungespaltene Peptid läuft (vgl. Abb. 50). Die Laufhöhe des gespaltenen C-terminalen PC2-Fragmentes (AS 680-796) entspricht damit dem nach Datenbankrecherchen errechneten Molekulargewicht von etwa 14 kDa. Weiterhin ist zu sehen, dass die Probe mit dem gespaltenem Peptid frei von Kontaminationen durch andere Proteine ist (Abb. 50). Aufgrund der geringen Größe des His-Epitops kann davon ausgegangen werden, dass dieses im Falle einer Koelution mit dem C-terminalen Fragment von PC2C (AS 680-796) bei 100 mM Imidazol durch die Porengröße der Dialysekassette (3,5 kDa) und des Konzentratorröhrchens (5 kDa) entfernt wurde. Dies konnte durch Blot-Analysen der ankonzentrierten Probe mit einem anti-His-Antikörper bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten ebenfalls, dass die untersuchten Proben keinesfalls mit koeluiertem, ungespaltenem Protein verunreinigt waren (vgl. auch Abb. 50).

B. Aufreinigung des Proteinproduktes von pET47b/PKD2(797-968)

Im Falle des Translationsproduktes von pET47b/PKD2(797-968) erwies sich der Bakterienstamm Rosetta(DE3)pLysS am geeignetsten für die Produktion des Fusionsproteins. Induktionskinetiken ergaben, dass mit einer 14-stündigen Induktion bei 37°C (Induktionsstartpunkt bei OD 0,5) aus 1 Liter M9-Kultur (2.2.1.E) zwischen 25 bis 30 mg Protein gewonnen werden können (die Elution erfolgte mit Imidazol). Unter Abbildung 51 sind 10 µg des Proteinproduktes von pET47b/PKD2(797-968) nach Elution von der Nickel-Säule zu sehen.

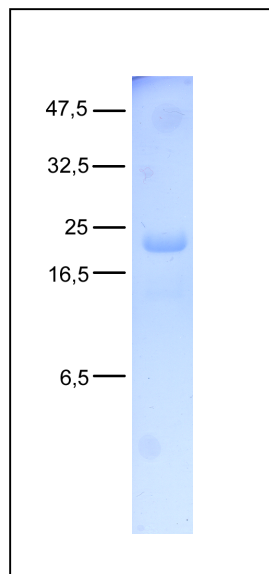


Abb. 51: Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) nach Elution von der Nickel-Säule. Transformierte (2.2.1.D) Rosetta(DE3)-Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert (vgl. auch 2.2.1.E) und das Lysat auf eine Nickel-Säule aufgetragen (vgl. auch 2.2.4.E). Nach der Elution wurden die „proteinhaltigen Eluatfraktionen“ vereinigt und 10 µg Protein auf ein 20%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (s. auch 2.2.4.B und C). **Das Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) läuft auf der berechneten Molekulargewichtshöhe und ist frei von Kontaminationen.**

Aus Abbildung 51 ist zu entnehmen, dass das Protein ohne Kontaminationen von der Säule eluiert und auf der nach Datenbankrecherchen ermittelten Molekulargewichtshöhe von ~21,5 kDa läuft. Auch bei diesem Protein wurde das N-terminale His-Epitop abgespalten. Hierzu wurde das von der Nickel-Säule eluierte Protein in Lösung mit der His-fusionierten Endoprotease HRV 3C gespalten (vgl. auch 2.2.4.I). Um die Protease und das His-Epitop zu entfernen, wurde der Ansatz auf eine Nickel-Säule aufgetragen. Auch hier war zu beobachten, dass das C-terminale Fragment von PC2 (AS 797-968) mit den Nickel-Ionen in Wechselwirkung trat (zu 100%; Daten nicht gezeigt). Durch Verwendung von 100 mM Imidazol konnte das Fragment jedoch von der Säule eluiert werden. Western-Blot-Analysen dieser Imidazolfraktionen mit einem anti-His-Antikörper zeigten, dass keinerlei Proteinase-Kontaminationen (die 22 kDa große Protease eluiert erst bei 1 M Imidazol von der Säule) bzw. Kontaminationen in Form von koeluiertem, ungespaltenem Protein oder freiem His-Epitop enthalten waren (Daten nicht gezeigt). Die proteinhaltigen Imidazol-Fractionen wurden anschließend vereinigt und gegen 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6,8/500 mM NaCl

dialysiert und mittels Ultrafiltration auf etwa 1 mM (Bradford-Wert) ankonzentriert. Aus einem solchen Pool wurden vor der Dialyse und Ankonzentrierung 20 µg des gespaltenen Proteins auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, wobei zur besseren Veranschaulichung der His-Abspaltung 5 µg an ungespaltenem Protein mitaufgetragen wurden (Abb. 52).

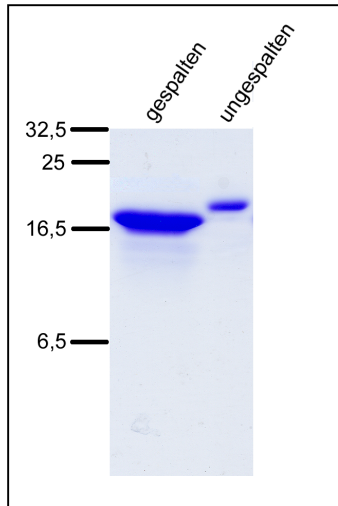


Abb. 52: C-terminales Fragment von PC2 (AS 797-968) nach dem Verdau des Proteinproduktes von pET47b/PKD2(797-968) mit HRV 3C. Das Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) wurde in Lösung einer Spaltreaktion mit der His-fusionierten HRV 3C-Protease unterzogen. Zur Abtrennung der Protease und der Histidine wurde der Verdau über eine Nickel-Säule gegeben, wobei PC2C mit Imidazol von der Säule eluiert werden musste. Die Elutionsfraktionen von PC2C wurden anschließend vereinigt. Dann wurden 20 µg gespaltenes und 5 µg ungespaltenes Protein auf ein 20%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das mit Coomassie gefärbt wurde (2.2.4.B und C). **Das His-freie Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) hat die erwartete Molekulargröße und ist frei von Kontaminationen.**

Aus Abbildung 52 ist zu ersehen, dass die Bande für das gespalte Peptid deutlich unterhalb der Bande für das ungespalte Peptid läuft und von der Laufhöhe dem nach Datenbanken ermittelten Molekulargewicht von 19,5 kDa entspricht. Weiterhin ist anzumerken, dass keine Kontaminationen durch andere Proteine zu erkennen sind (Abb. 52). Ein Aliquot eines solchen Imidazol-Fraktionspools wurde zur Ansequenzierung an Herrn Prof. Deutzmann (Universität Regensburg) gegeben. Die Ansequenzierung zeigte lediglich die ersten N-terminalen Aminosäuren des His-freien, C-terminalen Peptides von PC2 (AS 797-968) an, was nochmals unterstreicht, dass die Probe weder durch koeluierte Protease oder ungespaltenes Protein kontaminiert war (vgl. auch Abb. 52). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Protease exakt an der nach Herstellerangaben zu erwartenden Stelle gespalten hat und somit spezifisch wirkt.

3.4.2 NMR-Untersuchungen für den C-Terminus von Polycystin-2

Die NMR-Messungen für die im vorherigen Abschnitt besprochenen Proteine wurden von Dr. Frank Schumann am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer) durchgeführt. Die Messungen wurden bei 293 Kelvin (= 20°C) an einem Avance 800 MHz NMR-Gerät der Firma BRUKER BIOSPIN (Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt.

A. NMR-Messungen für das Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968)

Das größere der beiden C-terminalen Fragmente von PC2, das für die NMR-Messungen vorgesehen war, wurde nach dem unter 3.4.1.B erläuterten Prinzip aufgereinigt und das N-terminale His-Epitop wurde abgespalten (vgl. auch 2.2.4.I). Um eine bessere Auflösung der NMR-Spektren zu bekommen, wurde das Peptid ^{15}N -markiert (vgl. auch 2.2.1.E) und ein HSQC-Spektrum (Heteronuclear Single Quantum Coherence) gemessen. In einem HSQC-Experiment wird in einem 2D-Spektrum die Stickstofffrequenz mit der des gebundenen Amidprotons innerhalb einer NH-Gruppe verknüpft (Lottspeich und Zorbas, 1998). Jedes Signal im HSQC-Spektrum entspricht somit einem Amidstickstoff mit dem daran gebundenem Proton. Daher besteht das Spektrum im Wesentlichen aus den Aminogruppen des Proteinerückgrats und zusätzlich aus den Signalen der NH_2 -Gruppen der Seitenketten von Asn und Gln bzw. der aromatischen H^{N} -Protonen von Trp und His (Lottspeich und Zorbas, 1998). Auf diese Weise können im ^1H -Spektrum (1D) überlappende Amidprotonenresonanzen durch Einführen der zweiten Dimension (Stickstoffdimension) besser getrennt dargestellt werden. Das Spektrum eines solchen HSQC-Experimentes für das His-freie Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) ist in Abbildung 53 dargestellt.

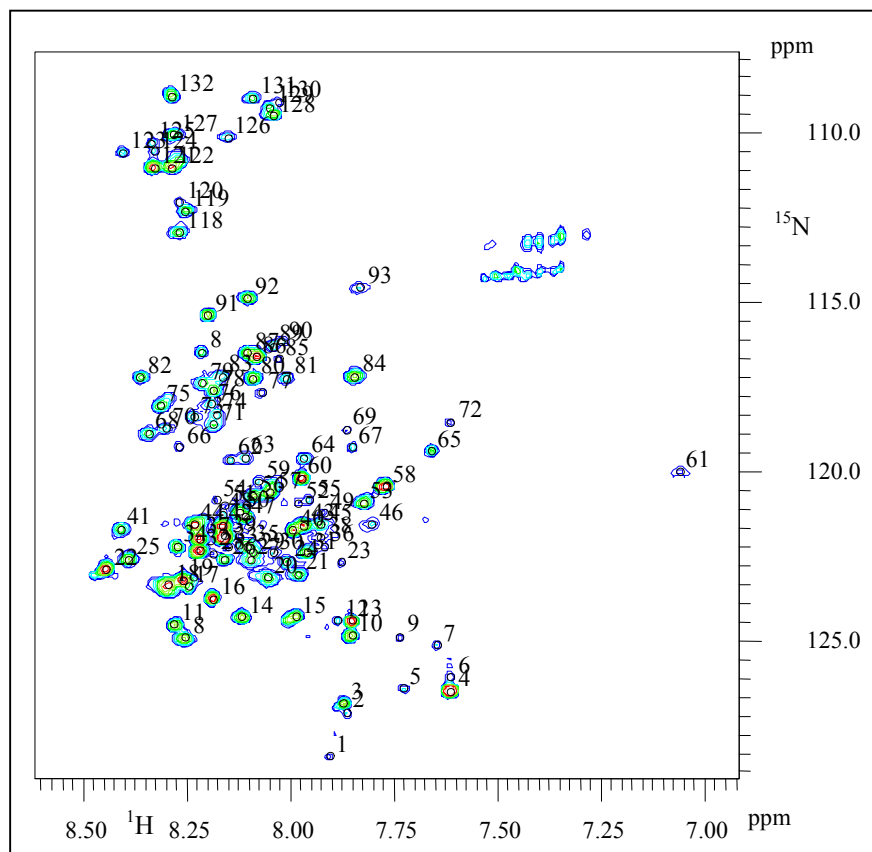


Abb. 53: Ausschnitt aus einem HSQC-Spektrum für das Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) [Dr. F. Schumann]. Das Proteinprodukt von pET47b/PKD2(797-968) wurde wie

unter 3.4.1.B beschrieben aufgereinigt und das N-terminale His-Epitop abgespalten (2.2.4.I). Anschließend wurde das Protein in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,8/500 mM NaCl dialysiert (2.2.4.G) und auf 1 mM ankonzentriert (2.2.4.H). Von dem Protein wurde an einem 800 MHz-NMR-Gerät ein HSQC-Spektrum aufgenommen, wobei das Messvolumen sich folgendermaßen zusammensetzte: 450 μ l Probe, 45 μ l D_2O und 5 μ l 10 mM DSS, das als Standard diente. Die chemischen Verschiebungen für Stickstoff sind vertikal, die für Protonen horizontal aufgetragen, wobei als Einheit ppm dient. Die Nummerierungen entsprechen den gezählten Aminosäuresignalen (keine Zuordnung). **Der größte Teil des Proteinproduktes von pET47b/PKD2(797-968) scheint unstrukturiert zu sein.**

Aus dem Spektrum ist zu erkennen, dass sich die meisten Aminosäuren im mittleren Bereich des Spektrums konzentrieren, was andeutet, dass ein Großteil des Peptides unstrukturiert vorliegt (pers. Mitteilung Dr. F. Schumann). Insgesamt konnten 132 der 190 zu erwartenden Aminosäuresignale gezählt werden (vgl. Zahlenangaben in Abb. 53). Die Tatsache, dass trotz His-Abspaltung und ^{15}N -Markierung immer noch ungefähr ein Drittel der Aminosäuren des Peptides nicht detektierbar sind, kann unter anderem dadurch begründet sein, dass sowohl NMR-Diffusionsmessungen als auch Gelfiltrationsstudien darauf hindeuten, dass das Peptid als Oligomer vorliegt (pers. Mitteilung Dr. F. Schumann). Die Diffusionsmessungen sprechen dabei eher für ein Dimer, die Gelfiltrationsdaten hingegen eher für ein Tetramer, was auf das unterschiedliche Auftrennungsvermögen der Techniken zurückzuführen sein kann. Dieser Befund über die Oligomerisierung ist im Hinblick auf die Tatsache interessant, dass der für die homomere Interaktion von PC2 erforderliche Bereich bereits auf den Abschnitt von Aminosäure 742-871 eingegrenzt werden konnte (Qian et al., 1997; Tsiokas et al, 1997; vgl. auch 1.3). Somit legen die im Verlauf der NMR-Studien erhaltenen Daten nahe, dass der Anfangsbereich der homomeren Interaktionsdomäne für Polycystin-2 erst bei Aminosäure 797 oder noch weiter C-terminal liegt. Ein Verdau des (His-freien) Proteinproduktes von pET47b/PKD2(797-968) mit der Endoprotease Trypsin sollte daher den minimalen, für die homomere Interaktion benötigten Aminosäurebereich freilegen, indem die nicht an der Interaktion beteiligten Domänen abgedaut werden (Daten nicht gezeigt, durchgeführt am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie). Dieser Minimalbereich sollte dann in rekombinanter Form für die NMR-Strukturaufklärung des C-Terminus von PC2 herangezogen werden, da durch die reduzierte Aminosäurezahl vermutlich eine bessere Auflösung in den Spektren erzielt werden würde. Die im Coomassie-Gel detektierten Banden der Verdaufragmente (Daten nicht gezeigt) wurden ausgeschnitten und zur Massenbestimmung und Ansequenzierung an Herrn Prof. Deutzmann (Universität Regensburg) gegeben. Das Resultat dieser Analysen war, dass Verdaufragmente mit den Massen 13370 Da, 13066 Da, 10840 Da, 10528 Da und 7742 Da auftraten, die alle mit der Aminosäuresequenz GSISS begannen, wobei das Glycin der Aminosäureposition 828 von PC2 entspricht.

Daher wurde beschlossen, den Bereich von Aminosäure 828 bis 900 rekombinant als GST-Fusionsprotein zu produzieren (Kapzan, 2006), da dieser Bereich im Bezug auf das Molekulargewicht dem kleinsten Fragment aus der massenspektroskopischen Analyse entspricht und da um die Aminosäure 900 gehäuft potentielle Trypsin-Spaltstellen liegen. Um zu überprüfen, ob dieses Fragment noch in der Lage ist, mit dem C-Terminus von PC2 zu interagieren, wurde eine Immunpräzipitationsstudie zwischen dem mit GST fusionierten, C-terminalen PC2-Peptid (AS 828-900) und einem His-fusionierten, Volllängen C-Terminus von PC2 (AS 680-968) durchgeführt (Kapzan, 2006). Es zeigte sich jedoch, dass das verkürzte C-terminale Fragment von Polycystin-2 nicht mehr in der Lage ist, mit dem C-Terminus von Polycystin-2 zu interagieren (Kapzan, 2006). Für die widersprüchlichen Ergebnisse aus den IP-Experimenten und dem Trypsinverdau kann es mehrere Erklärungen geben. So könnten beispielsweise bei dem Verdau elementare Bereiche für die Faltung der Proteine abgedaut worden sein, die letztlich die homomere Interaktion beeinflussen können. Da ein experimenteller Ansatz zur Klärung der Ursache für die kontroversen Ergebnisse zum einen sehr zeitaufwendig und auch wenig vielversprechend im Hinblick auf die Aussagekraft für den weiteren Ausgang des Strukturprojektes war, wurde daher ein besonderes Augenmerk auf die strukturelle Charakterisierung des Translationsproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) gelegt.

B. NMR-Messungen für das Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796)

Das N-terminale Fragment des C-Terminus von PC2 (AS 680-796), das für die NMR-Analyse konzipiert wurde, wurde nach dem unter 3.4.1.A vorgestellten Schema aufgereinigt. Für die NMR-Messungen wurde das N-terminale His-Epitop abgespalten. Um auch für dieses Peptid eine bessere Auflösung in den NMR-Spektren zu erzielen, wurde das Peptid zunächst ¹⁵N markiert und dann ein HSQC-Experiment (siehe auch 3.4.2.A) durchgeführt (Abb. 54a und b).

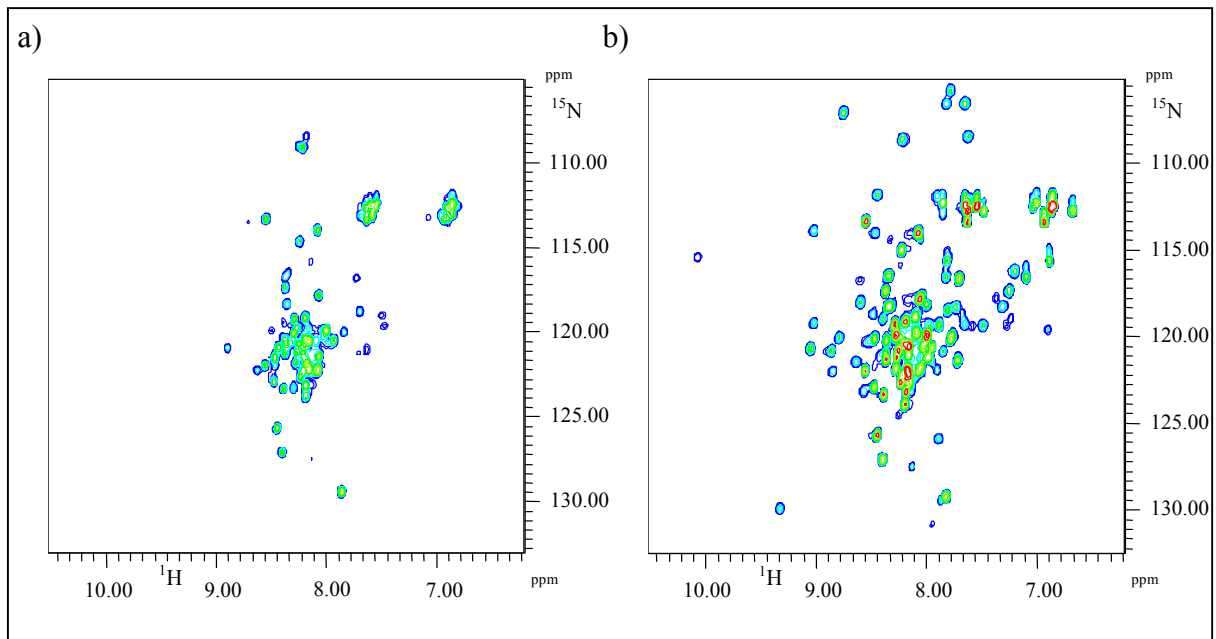


Abb. 54: Ausschnitt aus einem HSQC-Spektrum des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) [Dr. F. Schuhmann]. Das Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) wurde wie unter 3.4.1.A beschrieben aufgereinigt und das N-terminale His-Epitop abgespalten (2.2.4.I). Anschließend wurde das Protein in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,8/500 mM NaCl dialysiert (2.2.4.G) und auf 0,5 mM ankonzentriert (2.2.4.I). Von dem Protein wurde an einem 800 MHz-NMR-Gerät ein HSQC-Spektrum gemessen, wobei das Messvolumen sich folgendermaßen zusammensetzte: 450 μ l Probe, 45 μ l D_2O und 5 μ l 10 mM DSS, das als Standard diente. **a:** Messung ohne Ca^{2+} -Zugabe; **b:** Messung unter Zugabe von 5 mM Ca^{2+} . Die chemischen Verschiebungen für Stickstoff sind vertikal, die für Protonen horizontal aufgetragen, wobei als Einheit ppm dient. **Ein großer Teil des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) liegt unstrukturiert vor, erst bei Zugabe von Calcium wird ein Teil des Proteins strukturiert.**

In Abbildung 54a ist zu erkennen, dass sich die meisten Aminosäuresignale wie bei dem größeren C-terminalen Fragment von PC2 (AS 797-968; vgl. auch 3.4.2.A) im mittleren Bereich des Spektrums liegen. Somit scheint ein Großteil des Peptides ungefaltet zu sein, da vermutlich ein schnelles Gleichgewicht zwischen verschiedenen „random-coil-Konformationszuständen“ vorherrscht (pers. Mitteilung Dr. F. Schumann). Da das zu untersuchende Peptid ein sog. EF-Hand-Motiv beinhaltet und die Zugabe von Calcium bei sog. EF-Hand-Proteinen zu Konformationsänderungen unterschiedlichen Ausmaßes führen kann (Gifford et al., 2007), wurden zu der in Abb. 54a gezeigten, ^{15}N -markierten Probe 5 mM $CaCl_2$ gegeben und ein HSQC-Experiment durchgeführt (Abb. 54b). Die Zugabe des Ions führt zu einer besseren Auflösung des Spektrums, es sind deutlich mehr Aminosäuresignale zu sehen (Abb. 54b). So scheint ein Teil des Proteins erst bei Anwesenheit von Calcium strukturiert vorzuliegen. Dies war nicht zu beobachten, wenn 5 mM Mg^{2+} , einem Ion, das chemisch gesehen dem Calcium sehr ähnlich ist, zugegeben wurden (pers. Mitteilung Dr. Frank Schumann). Dies impliziert, dass die strukturellen Veränderungen im Spektrum (Abb. 54a und b) spezifisch auf Calcium zurückzuführen sind. Bei einem C-terminalen Peptid von PC2, das die Aminosäuren 680-769 umfasste [pET28aΔT7/PKD2(680-769); vgl. auch

2.1.8.A] war ein solcher Effekt bei Zugabe von Calcium nicht zu beobachten (pers. Mitteilung von Dr. Frank Schumann). Da dieses C-terminale Fragment von Polycystin-2 mitten im Schleifenbereich der postulierten EF-Hand-Domäne (AS 754-782) abgeschnitten ist, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die im NMR-Spektrum zu beobachtenden Veränderungen ausschließlich der Wechselwirkung von Calcium mit dem EF-Hand-Motiv zuzuschreiben sind.

Im Falle des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) konnten über die chemische Verschiebung von Aminosäuresignalen bereits erste Hinweise auf Sekundärstrukturelemente gewonnen werden. Die chemische Verschiebung von Aminosäuresignalen ändert sich gegenüber dem ungefalteten Zustand, wenn sich die Aminosäure in einem Sekundärstrukturelement befindet (Lottspeich und Zorbas, 1998). Dieser Unterschied in der chemischen Verschiebung wird auch als chemischer Verschiebungsindex (CSI: chemical shift index) bezeichnet (Lottspeich und Zorbas, 1998). Der chemische Verschiebungsindex spiegelt die Gleichförmigkeit der chemischen Umgebung z.B. von $C\alpha$ -Atomen in einem regulären Sekundärstrukturelement wider (Lottspeich und Zorbas, 1998). So wird zwischen Verschiebungen im Bezug auf den „random-coil-Wert“ nach tieferem Feld (= höhere ppm-Werte), in β -Faltblätter, bzw. nach hohem Feld (= niedrigere ppm-Werte), in α -Helices, unterschieden (Lottspeich und Zorbas, 1998). In Abbildung 55 sind die $C\alpha$ -Verschiebungen dokumentiert, die mit Tripelresonanzexperimenten an dem ^{15}N - und ^{13}C -markierten Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) bei Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 bestimmt wurden. Insgesamt konnte für 79 der 123 zu erwartenden Aminosäuresignale eine vorläufige Aussage über deren Anordnung in Sekundärstrukturelementen gemacht werden (Abb. 55).

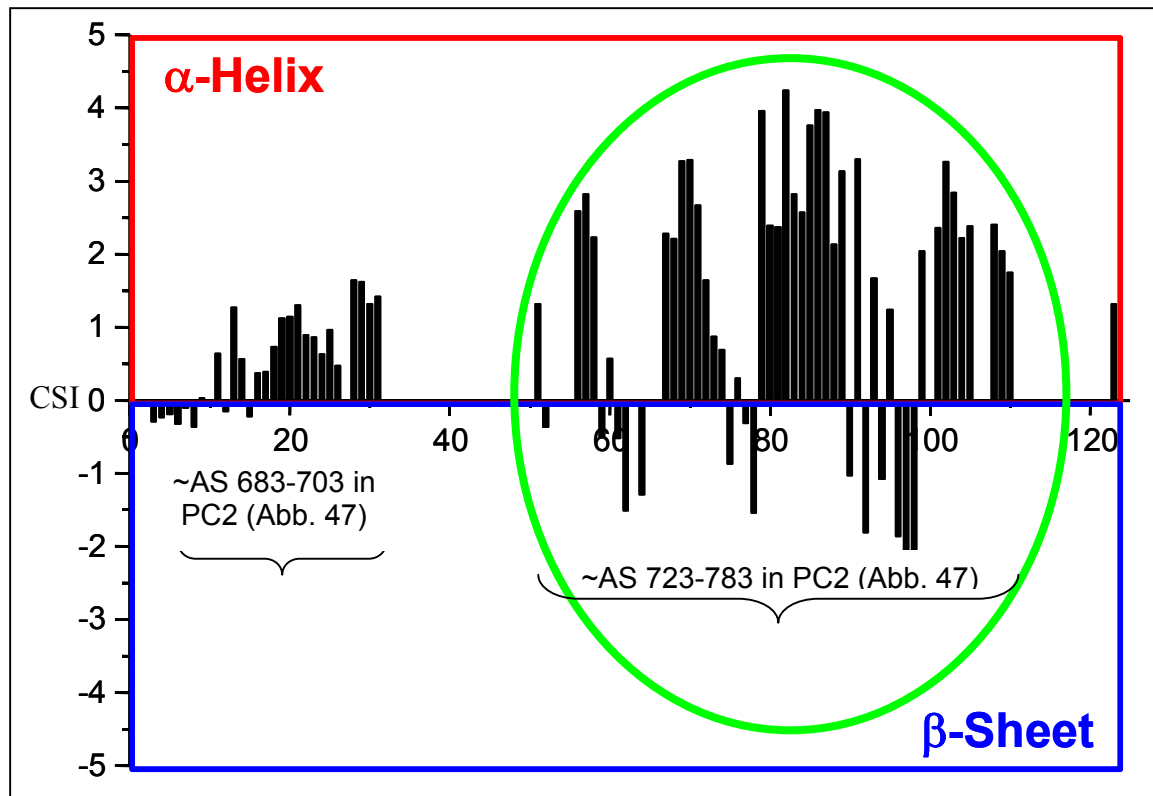


Abb. 55: Sequentielle Zuordnung der Aminosäuren des Proteinproduktes von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) zu Sekundärstrukturelementen (Dr. F. Schumann). Für die Zuordnung der Aminosäuren des Proteinproduktes von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) zu α -Helices bzw. β -Faltblättern wurde ein 3D Tripelexperiment mit dem ^{15}N - und ^{13}C -markierten Protein (0,78 mM) an einem 800 MHz-NMR-Gerät durchgeführt (unter Zugabe von 5 mM CaCl_2). Die Zuordnung erfolgte über die Ermittlung des chemical shift index (CSI) für Kohlenstoff. Die Nummerierung entspricht der Anzahl der Aminosäuren (Σ 123) des His-freien Proteinproduktes von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796). **Ein großer Teil des Proteinproduktes von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) liegt in α -Helices vor. Somit stimmt die NMR-Analyse gut mit der Strukturvorhersage (Abb. 47) überein.**

Nach Abbildung 55 zu urteilen konnte der größte Teil der Aminosäuren dem Sekundärstrukturelement der α -Helix zugeordnet werden, was mit der Sekundärstrukturvorhersage aus Abbildung 47 übereinstimmt (bitte beachten: die Nummerierung in Abb. 55 umfasst auch die ersten 6 durch das Vektorrückgrat bedingten Aminosäuren, die in Abb. 47 natürlich nicht enthalten sind). Entsprechend der NMR-Analyse liegt im Bereich von Aminosäure 50-110 (bzw. ~AS 723-783; vgl. auch grüne Umrandung in Abb. 55) ein paarweise angeordnetes Helix-Loop-Helix-Motiv, das auch in der Strukturvorhersage (Abb. 47: ~AS 722-788) zu sehen ist. Das weiter C-terminal gelegene der beiden Helix-Loop-Helix-Motive (Abb. 55: ~AS 80-110 bzw. ~AS 753-783) fällt ziemlich genau auf den nach Datenbankrecherchen als EF-Hand-Motiv deklarierten Bereich von AS 754-782 (vgl. Abb. 47). Der einzige Unterschied zwischen dem vorhergesagten Modell und der NMR-Analyse besteht in den durch die NMR detektierten β -Faltblattstrukturen (sehr kurze Bereiche) in den Schleifenbereichen der Helix-Loop-Helix-Motive. Auch das laut

NMR-Analyse im N-terminalen Bereich des Peptides zu sehende helikale Motiv (Abb. 55: ~AS 10-30 bzw. ~AS 683-703) ist bereits in der Strukturvorhersage angedeutet (vgl. Abb. 47).

3.4.3 Calcium-Bindungsstudien mit dem Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch Zugabe von Calcium ein Teil des Translationsproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) strukturiert wird (3.4.2.B), lag die Hypothese nahe, dass Calcium mit der in diesem Fragment enthaltenen EF-Hand wechselwirkt. Mehrere Studien schreiben der EF-Hand eine regulierende Funktion hinsichtlich der Kanalaktivität von Polycystin-2 zu (vgl. 1.4). So soll die Aktivität des Kanals durch Applikation von intrazellulärem Calcium gesteigert werden (Koulen et al., 2002; vgl. auch 1.4). Um die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen PC2 und Calcium besser beurteilen zu können, wurde daher beschlossen, Bindungstests mit dem (His-freien) Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) und Calcium durchzuführen, um so beispielsweise Bindungsparameter wie den K_d -Wert zu erhalten.

A. Calcium-Bindungsstudien über Fluoreszenzspektroskopie

Aufgrund der unter 3.3 erläuterten Nachteile der als Saturationsstudien bekannten Techniken wurde auch für die geplanten Calciums-Bindungstests eine markierungsfreie Methode vorgezogen. Da die Quarzmikrowaage für Interaktionsstudien mit Calcium nicht sensitiv genug ist (pers. Mitteilung Prof. Dr. C. Steinem) und das Protein ohne das His-Epitop nicht mehr an der Membran zu immobilisieren wäre, wurden zunächst ITC-Messungen (Isothermal Titration Calorimetry) am Institut für Organische Chemie (Prof. Dr. B. König) durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Ligandlösung in vorher festgelegten Volumenschritten maschinell (mit einer Spritze) zu einer vorgelegten Proteinlösung gegeben, wobei die in Folge einer Interaktion zwischen Ligand und Protein freigesetzte bzw. aufgenommene Wärme gemessen wird. Im Rahmen von ITC-Vorversuchen mit Proteinproben im Konzentrationsbereich von 40 μ M (gemessen nach Absorptionsspektrum; vgl. auch 2.2.4.A) konnte eine Bindung von Calcium an das Protein beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Um jedoch verlässliche Werte für die Dissoziationskonstante zu erhalten, hätten Mehrfachmessungen mit deutlich höheren Proteinkonzentrationen (1 mM und höher) durchgeführt

werden müssen, die aufgrund der nötigen Probenvolumina (2,5 ml pro Messung) zu kostspielig geworden wären und einen erheblichen Zeitaufwand im Hinblick auf die Proteinaufreinigung dargestellt hätten. Daher wurde dieser Ansatz verworfen. Um trotzdem ohne Radioaktiv-Markierung arbeiten zu können, wurde die sog. Fluoreszenzspektroskopie (vgl. auch 2.2.4.J) verwendet (die Messungen wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. R. Sterner durchgeführt).

Bei dieser Technik wird die Möglichkeit ausgenutzt, dass ein photochemisch angeregtes Molekül nicht nur durch strahlungsbedingte Relaxation, bei der die Energiedifferenz letztlich als Wärme (in Form von Schwingungsenergie) abgegeben wird, sondern auch über Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehren kann. Beträgt die Dauer der Rückkehr aus einem der angeregten Zustände in einen Zustand niedrigerer Energie oder den Grundzustand Millisekunden oder Sekunden, so wird dies als Phosphoreszenz bezeichnet, beträgt die Dauer der Rückkehr hingegen 10^{-9} bis 10^{-7} Sekunden, so verwendet man den Begriff Fluoreszenz. Aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin zeigen Absorptionsbanden bei 280 nm, so dass die Fluoreszenz dieses elektronischen Überganges bei Wellenlängen oberhalb von 300-350 nm beobachtet werden kann (Lottspeich und Zorbas, 1998). Dynamische Prozesse wie beispielsweise die Interaktion eines Proteins mit seinem Liganden können Veränderungen in der Fluoreszenzintensität aber auch in einer Verschiebung von Emissionsspektren zu kürzeren oder längeren Wellenlängen hin hervorrufen, was beispielsweise unter anderem mit einer durch strukturelle Veränderungen einhergehenden Lageänderung von Aminosäuren begründet werden kann (Lakowicz, 1999). Übertragen auf die im NMR-Spektrum beobachteten Struktur-Veränderungen des Proteinproduktes von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) bei Zugabe von Calcium bestand daher die Hoffnung, den K_d -Wert der Interaktion zwischen Calcium und dem genannten Protein über Änderungen der soeben erwähnten Parameter zu ermitteln. Im Falle des kleineren C-terminalen Fragmentes von PC2 (AS 680-796) wurde die Tatsache ausgenutzt, dass dieses 3 endogene Tyrosin-Reste (AS-Position: 684, 708, 762) und zwei endogene Phenylalanin-Reste (AS-Position 738 und 759) besitzt, wobei letztere jedoch aufgrund ihrer geringen Quantenausbeute in Gegenwart von Aminosäuren wie Tyrosin bzw. Tryptophan nicht merklich detektierbar sind (Daten nicht gezeigt; Lottspeich und Zorbas, 1998).

Für die Messungen wurden 50 μM (gemessen nach Absorption, vgl. auch 2.2.4.A) des Translationsproduktes von pET41a $\Delta\text{GST}/\text{His}$ -Thrombin-PKD2(680-796) in einem Puffer der Zusammensetzung 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl vorgelegt, da bei dem weiter oben erwähnten $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (vgl. auch 3.4.1) die Gefahr der Ausbildung von unlöslichen Calciumphosphatkomplexen während der Titration bestand. Insgesamt wurden 60 μl einer 10 mM konzentrierten CaCl_2 -Lösung (in 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl) in 1-2 μl -Schritten zutitriert, um die Verdünnung so gering wie möglich zu halten. Die Messung fand bei 22°C statt, wobei die Anregung bei 280 nm und die Aufzeichnung des Emissionsspektrums zwischen 290 und 310 nm vorgenommen wurde (vgl. Abb. 56a). Als Negativ-Kontrolle diente die Titration von Ligand-freiem Puffer (Abb. 56b).

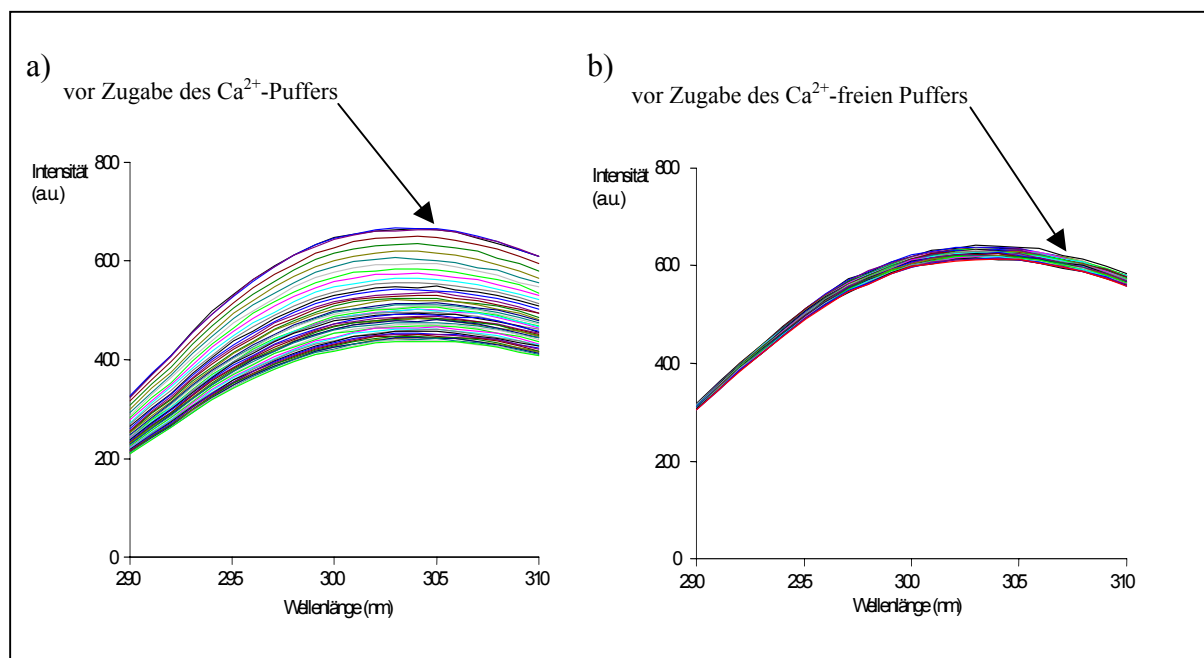


Abb. 56: Emissionsspektren bei der Calcium-Titration für das Proteinprodukt von pET41a $\Delta\text{GST}/\text{His}$ -Thrombin-PKD2(680-796). Zu einer 50 μM konzentrierten Lösung (5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl) des Proteinproduktes von pET41a $\Delta\text{GST}/\text{His}$ -Thrombin-PKD2(680-796) wurden zugegeben: **a:** 60 μl 10 mM CaCl_2 in 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl; **b:** 60 μl 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm und das Emissionsspektrum wurde in einem Bereich von 290-310 nm aufgezeichnet. Die Messung fand bei 22°C statt. **Die Zugabe von Calcium zu dem Proteinprodukt von pET41a $\Delta\text{GST}/\text{His}$ -Thrombin-PKD2(680-796) führt zu einem Absinken der Fluoreszenzintensität.**

Aus Abbildung 56a ist zu erkennen, dass die Zugabe von Calcium zu dem Protein zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt. Die geringfügige Abnahme der Fluoreszenz in Abbildung 56b ist vermutlich vollständig auf Verdünnungseffekte durch die Titration mit Calcium-freiem Puffer zurückzuführen und wurde zur Berechnung des K_d -Wertes von den Messwerten aus Abbildung 56a abgezogen.

Um die Calciumkontaminationen des zu untersuchenden Proteins möglichst niedrig zu halten, wurde das Protein über 3-4 Tage gegen den weiter oben erwähnten Tris-Puffer dialysiert, der in mit Chelex-Beads (binden zweiwertige Ionen) behandeltem Wasser angesetzt wurde (vgl. 2.2). Da jedoch aufgrund von Calcium-Kontaminationen in Chemikalien etc. trotz aller Vorsichtsmaßnahmen immer Spuren des Ions in Puffern zurückbleiben bzw. Calcium bereits während der Translation des Proteins im Bakterium mit diesem wechselwirken kann, wurden der Tris-Puffer und ein Aliquot aus dem für die Messung vorgesehenen Proteinpool einer ICP-OES Bestimmung (vgl. auch 2.2.4.M) unterzogen (die Messungen wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. M. Thomm durchgeführt). Bei dieser Methode können Elementbestimmungen in Lösungen bis in den ppb- bzw. ppt-Bereich genau vorgenommen werden (vgl. auch 2.2.4.M). Für den Puffer ergab sich somit eine Calciumkontamination von $0,35 \mu\text{M}$, für die Proteinlösung hingegen eine Kontamination von $8,4 \mu\text{M}$. Der Wert für die Pufferkontamination ist aufgrund seiner geringen Dimensionen vernachlässigbar. Daher wurde für die Ermittlung der Gesamt-Ligandkonzentration pro Titrationsschritt nur der Wert für die Calciumkontamination der vorgelegten Proteinlösung hinzuaddiert sowie die im Verlauf der Titration auftretende Verdünnung durch die Ligandlösung (Calcium) miteinbezogen. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzänderung bei 300 und 305 nm (Bereich der größten Fluoreszenzänderung) untersucht. Die im Verlauf der Calcium-Zugabe gemessenen Emissionswerte wurden von denjenigen der Puffer-Kontrolle (vgl. Abb. 56b) abgezogen, was direkt die relative Fluoreszenzänderung unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes ergibt. Diese Werte wurden anschließend gegen die Gesamt-Ligand-Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden mit der unter 2.2.4.J gezeigten Formel graphisch dargestellt (Abb. 57).

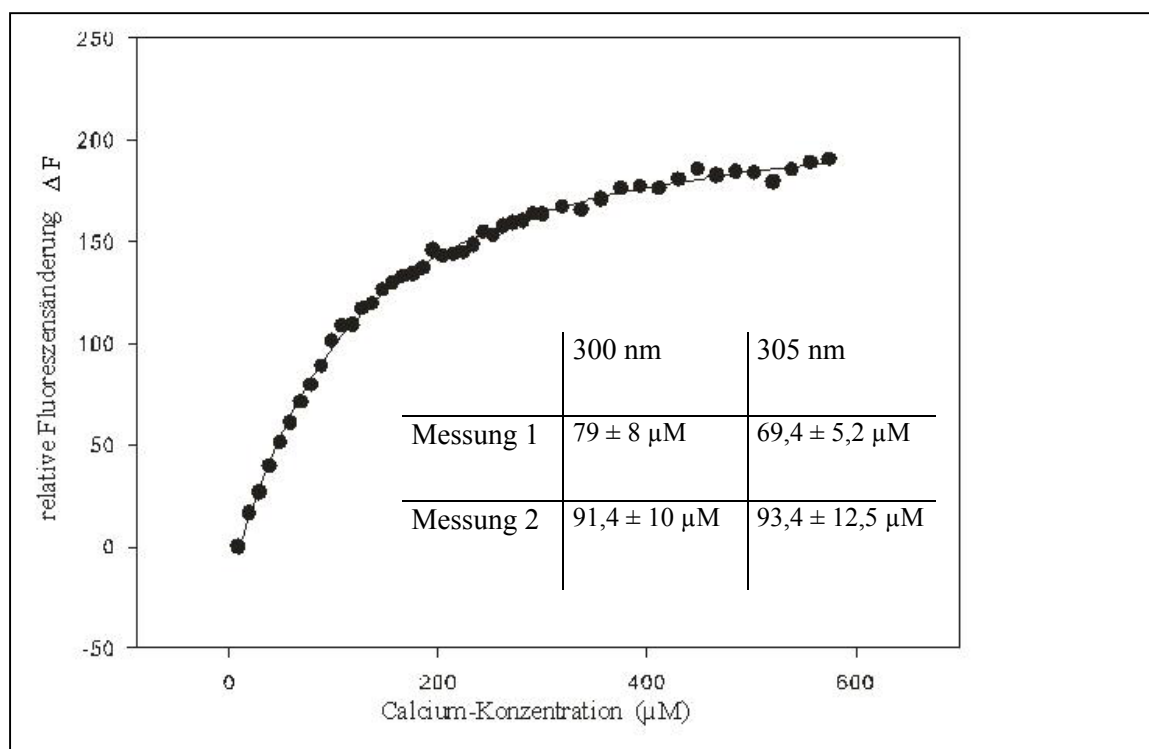


Abb. 57: Graphische Darstellung für die Datenpunkte (bei 300 nm) aus der unter Abb. 56 gezeigten Calcium-Titration. Die bei der unter Abb. 56a gezeigten Calcium-Titration gemessenen Emissionswerte wurden von den Emissionswerten der Puffer-Kontrolle (Abb. 56b) abgezogen und anschließend gegen die Gesamt-Ligandkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden mit der folgenden quadratischen Funktion, die die Ligand-Bindung beschreibt und die freie Ligandkonzentration berücksichtigt (2.2.4.K), graphisch dargestellt: $F = F_0 + (F_{\max} - F_0) * 0,5 * ((1 + (L_0 + K_d)/E_0) - ((1 + (L_0 + K_d)/E_0)^2 - 4 * L_0/E_0)^{0,5})$ mit L_0 : Gesamt-Ligandkonzentration, E_0 : Gesamt-Proteinkonzentration, F_0 : Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt 0, F_{\max} : maximale Fluoreszenzemissionsänderung, F : Fluoreszenzemission, die gemessen wird und K_d : Dissoziationskonstante. **Der aus der abgebildeten Kurve erhaltene K_d -Wert ist $79 \pm 8 \mu\text{M}$.**

Aus der unter Abbildung 57 dokumentierten Kurve konnte für die abgeleiteten Messwerte bei 300 nm ein K_d -Wert von $79 \pm 8 \mu\text{M}$ ermittelt werden (Messung 1, Tabelle in Abb. 57). Eine zweite unabhängige Messung (Messung 2) ergab einen K_d -Wert von $91,4 \pm 10 \mu\text{M}$ (vgl. Tabelle in Abb. 57). Aus der Tabelle in Abbildung 57 ist zu entnehmen, dass die Werte der 2. Messung insgesamt etwas höher liegen als die bei der ersten Messung. Im Großen und Ganzen liegen die Werte jedoch recht nahe beieinander, so dass ausgesagt werden kann, dass sich der K_d -Wert der Interaktion zwischen dem C-terminalen Fragment von PC2 (AS 680-796) und Calcium um einen Wert zwischen 70 bis 90 μM bewegt.

B. Calcium-Bindungsstudien über NMR

Parallel zu den Fluoreszenzspektroskopie-Versuchen wurden von Dr. Frank Schumann Calcium-Bindungsstudien über NMR durchgeführt, für die Protein aus der Aufreinigung verwendet wurde, die auch für die Spektroskopie-Messungen herangezogen wurde (vgl. 3.4.3.A). Hierzu wurde in einem 1D Protonen-Experiment Calcium in aufsteigenden

Konzentrationen (0-417 μM) zu einer 41,5 μM (gemessen über NMR) konzentrierten Lösung des Proteinproduktes von pET41a $\Delta\text{GST/His-Thrombin-PKD2(680-796)}$ gegeben, die sich in 5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl befand (Abb. 58).

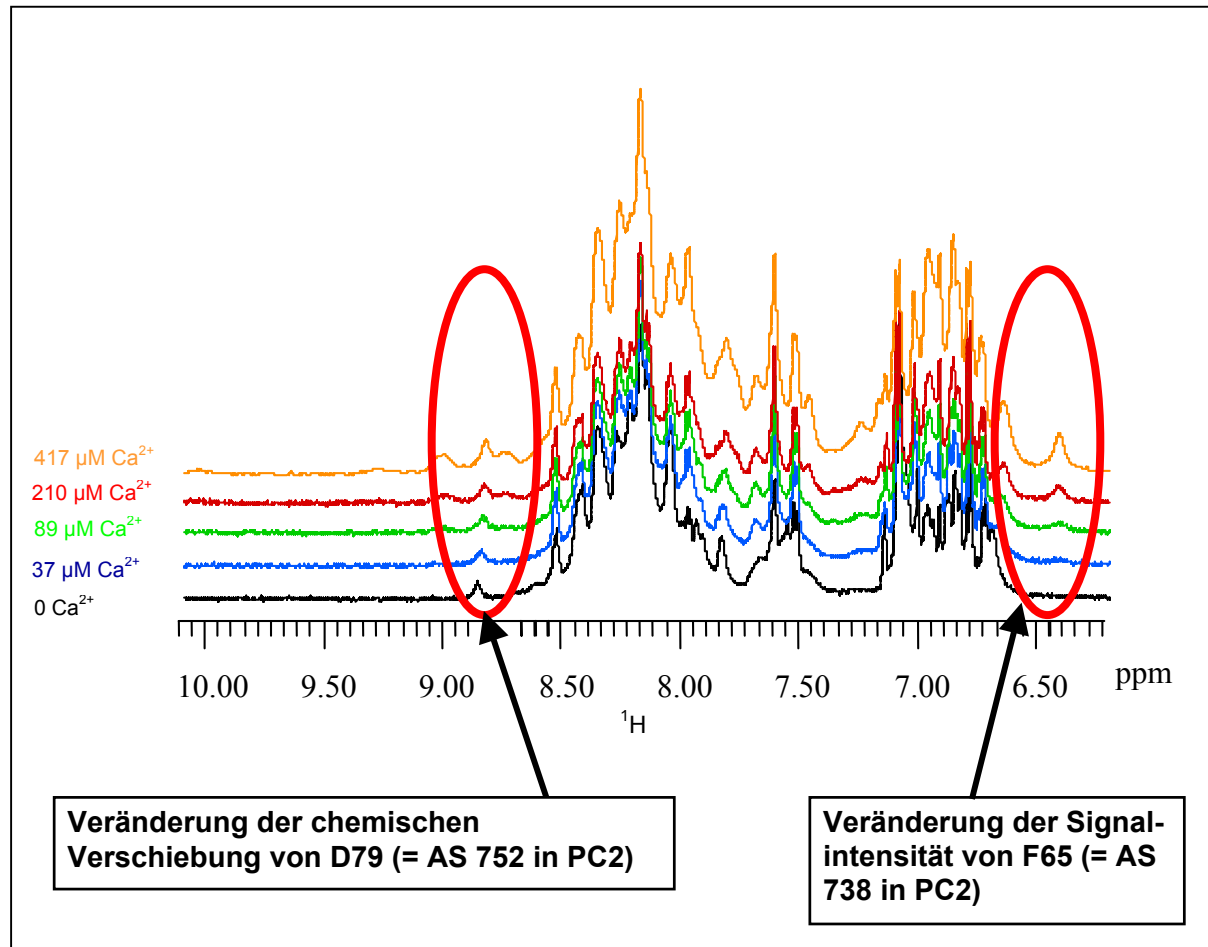


Abb. 58: 1D Protonen Spektrum einer Calcium-Titration für das Proteinprodukt von pET41a $\Delta\text{GST/His-Thrombin-PKD2(680-796)}$ [Dr. Frank Schumann]. In einem 1D Protonen-Experiment wurde CaCl_2 zu einer 41,5 μM konzentrierten Lösung (5 mM Tris-HCl pH 6,8/500 mM NaCl) des Proteinproduktes von pET41a $\Delta\text{GST/His-Thrombin-PKD2(680-796)}$ in den folgenden Konzentrationen zugegeben: 37 μM , 89 μM , 210 μM und 417 μM (hier wird nur ein Teil der Titrationsschritte gezeigt). Die Messung fand bei RT statt. Die Angaben D79 und F65 stellen die Aminosäurepositionen des His-freien Proteinproduktes von pET41a $\Delta\text{GST/His-Thrombin-PKD2(680-796)}$ dar. **Die Zugabe von Calcium zu dem Proteinprodukt von pET41a $\Delta\text{GST/His-Thrombin-PKD2(680-796)}$ führt zu strukturellen Veränderungen, was durch Veränderungen der chemischen Verschiebung bzw. durch Veränderungen der Signalintensität (siehe rote Ellipsen) bei verschiedenen Aminosäuren deutlich wird.**

Aus dem Spektrum ist zu entnehmen, dass die Zugabe von Calcium beispielsweise eine Veränderung der chemischen Verschiebung bei einem Phenylalanin-Rest an Position 65 (die Zahl entspricht der Nummerierung der Anzahl der Aminosäuren des His-freien Peptides; in PC2: AS 738) bewirkt und zu einer Veränderung der Signalintensität von einem Asparaginsäure-Rest an Position 79 (die Zahl entspricht der Nummerierung der Anzahl der Aminosäuren des His-freien Peptides; in PC2: AS 752) führt (Abb. 58, rote Ellipsen). Weiterhin fällt auf, dass die Veränderungen der Signalintensität bei F65 erst bei viel höheren

Calcium-Konzentrationen ($89 \mu\text{M}$) auftreten als die Veränderungen der chemischen Verschiebung bei D79. Trägt man die Veränderungen der chemischen Verschiebung von D79 bzw. die Veränderungen in der Signalintensität von F65 gegen die Gesamt-Konzentration von Calcium auf und stellt man die Datenpunkte mit der unter Abb. 57 gezeigten Formel graphisch dar (Daten nicht gezeigt; auch hier wurde die „Calcium-Kontamination“ und die bei der Calcium-Titration auftretende Verdünnung der Ligandlösung für die Gesamt-Konzentration an Calcium berücksichtigt), so erhält man folgende, vorläufige K_d -Werte. Für D79 erhält man den Wert von $51 \pm 4 \mu\text{M}$, für F65 erhält man hingegen $161 \pm 36 \mu\text{M}$ (pers. Mitteilung Dr. Frank Schumann). Da der Asparaginsäure-Rest (D79 bzw. D752) 2 Aminosäuren vor der nach Datenbankangaben ersten Aminosäure des postulierten EF-Hand-Motivs (AS 754-782) liegt (Abb. 47 und 55) und sich der Phenylalanin-Rest (F65 bzw. F738) mitten in dem Helix-Loop-Helix-Motiv befindet, das nach NMR-Analysen bzw. Strukturvorhersagen der EF-Hand vorgeschaltet sein soll (Abb. 51 und 59), liegt die Vermutung nahe, dass sich im C-Terminus von Polycystin-2 zwei unmittelbar aufeinanderfolgende EF-Hände befinden, die sich in ihrer Affinität zu Calcium leicht unterscheiden.

4 Diskussion

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) stellt mit einer Prävalenz von 1:1000 eine der häufigsten menschlichen Erbkrankheiten dar (Hayashi et al., 1997). Das klinische Spektrum der Krankheit beinhaltet renale und extrarenale Manifestationen (Gabow, 1993). Der primäre Phänotyp in der Niere besteht in der beidseitigen, multiplen Bildung von Zysten, die entlang des gesamten Nephrons auftreten (Hayashi et al., 1997). Bei 50% der betroffenen Patienten kommt es bis zum 60. Lebensjahr zum chronischen Nierenversagen. Bisher ist die Dialyse die einzig wirksame Therapieform, so dass die Aufklärung der Ursachen von ADPKD auf molekularer Ebene von immenser Bedeutung für das Verständnis der Krankheit und neue Therapieansätze darstellt.

ADPKD ist eine genetisch heterogene Krankheit, die durch Mutationen in wenigstens 2 verschiedenen Genen hervorgerufen werden kann (Reeders et al., 1985; Kimberling et al., 1993; Daoust et al., 1995). Während etwa 85% der Patienten Mutationen im *PKD1*-Gen tragen, sind in ungefähr 15% der Fälle Mutationen im *PKD2*-Gen zu finden, die restlichen Mutationen werden dem auch als *PKD3* bezeichneten Gen zugeschrieben, dessen Lokalisation allerdings noch unbekannt ist (Sutters, 2006).

Nach Hydrophobizitäts-Plots zu urteilen handelt es sich bei Polycystin-2 um ein 6 Transmembrandomänen umfassendes Protein (Mochizuki et al., 1996). Weiterhin ist über Polycystin-2 bekannt, dass es als nicht selektiver Kationen-Kanal (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002; Luo et al., 2003), in der Membran des ER und des Ziliums fungiert, wobei die subzelluläre Lokalisation des Proteins kontrovers diskutiert wird. So wird neben dem ER z.T. auch eine Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran beschrieben (Witzgall, 2005). Mittlerweile konnten bereits 15 Interaktionspartner für das Kanalprotein identifiziert werden, wobei diese vornehmlich mit dem C-Terminus des Proteins wechselwirken.

Bisher ist allerdings noch völlig unklar, inwiefern Mutationen im *PKD2*-Gen mit dem Entstehen von ADPKD in Verbindung zu bringen sind, da bisher noch keine „Hot-Spots“ für Mutationen gefunden wurden. Auch die funktionelle Bedeutung der diversen Interaktionen von Polycystin-2 und deren Regulation sind zum großen Teil noch unerforscht. Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag daher in der strukturellen und funktionellen

Charakterisierung des Proteins. Die strukturelle Charakterisierung des Proteins fand zum einen über Topologie-Studien und zum anderen über NMR-Analysen des C-Terminus von Polycystin-2 statt. Ein zweiter Aspekt dieser Arbeit lag in der Durchführung von Bindungsanalysen zur Bestimmung von Bindungsparametern der Interaktionen von Polycystin-2 mit Bindungspartnern wie Polycystin-1, PIGEA-14 oder Calcium, um so die funktionelle Relevanz der Interaktionen besser beurteilen zu können. Ein weiterer Punkt beinhaltete die Charakterisierung eines plasmamembranspezifischen Exportsignals, das zum besseren Verständnis der intrazellulären Lokalisation von PC2 beitragen sollte.

4.1 Strukturelle Charakterisierung von Polycystin-2

Integrale Membranproteine wie Polycystin-2 stellen eine wichtige Protein-Klasse dar, die in ein breites Spektrum von zellulären Prozessen involviert ist. Die Strukturkenntnisse solcher Proteine sind elementar, um deren Funktion besser verstehen zu können. Bisher gibt es leider keine generellen bzw. verlässlichen Methoden, um dreidimensionale Kristalle von Membranproteinen zu erzeugen, die für kristallographische Analysen geeignet sind. Auch sind bisher im Gegensatz zu der Vielzahl von aufgelösten Strukturen globulärer Proteine nur sehr wenige hochaufgelöste Strukturen von Transmembranproteinen bekannt. Daher sind bisher Strukturvorhersagen und biochemische Analysen von Nöten, um strukturelle Informationen zu gewinnen (van Geest und Lolkema, 2000).

4.1.1 Topologische Charakterisierung von Polycystin-2

Ein fundamentaler Aspekt der Struktur von Membranproteinen ist zweifelsohne die sog. Membran-Topologie, das heißt die Anzahl von Transmembransegmenten und ihre Orientierung in der Membran. Grundlage jeder topologischen Charakterisierung ist die Analyse der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins mittels sog. Struktur-Vorhersageprogramme. Diese erstellen Vorhersagen, die auf den Beobachtungen basieren, dass a) die Transmembranhelices eine hohe durchschnittliche Hydrophobizität aufweisen und b) die hydrophilen Schleifen, welche die einzelnen Transmembransegmente verbinden, der sog. „positive inside“-Regel folgen, die besagt, dass nichttranslozierte Schleifen (zytoplasmatisch) im Gegensatz zu translozierten Schleifen (ER-Lumen bzw. extrazellulär) mit positiv geladenen Aminosäureresten angereichert sind (von Heijne, 1992, Lodish et al., 1996; von Heijne 2006). Die erste Beobachtung wird dazu verwendet, die Transmembransegmente zu

identifizieren, indem die hydrophoben Aminosäureabschnitte einer Sequenz analysiert werden (Kyte und Doolittle, 1982; Traxler et al., 1993; von Heijne, 1992; Claros und von Heijne, 1994; van Geest und Lolkema, 2000). Die zweite Beobachtung hingegen hilft, die generelle Orientierung des Proteins in der Membran zu bestimmen (Kyte und Doolittle, 1982; Hartmann et al., 1989). So wurde von Mochizuki et al. (1996) unter Verwendung von sog. Hydrophobizitäts-Algorithmen (Engelman und Streitz, 1981; Kyte und Doolittle, 1982; Hartmann et al., 1989; Sipos und von Heijne, 1993) ein 6 Transmembrandomänen umfassendes Modell aufgestellt, bei dem der N- und C-Terminus ins Zytoplasma ragen (vgl. auch 1.3). Dieses Modell wurde von der Swissprot-Datenbank etc. mit mehr oder wenigen kleinen Abweichungen bezüglich der Start- und Endpunkte der einzelnen Transmembransegmente bestätigt (vgl. auch 3.1.1 Abb. 4). Diese Abweichungen können dabei durch die verschiedenen Algorithmen erklärt werden, die bei den Hydrophobizitäts-Plots zur Anwendung kamen. Die deutlich divergierenden Aussagen über den zur Transmembrandomäne 4 gehörigen Sequenzbereich zwischen Mochizuki et al. (1996) und der Swissprot-Datenbank (vgl. Abb. 4) sind eventuell damit zu erklären, dass diese Domäne nach Mochizuki et al. (1996) zwar bei all den zur Erstellung des Topologie-Modells eingesetzten Hydrophobizitäts-Algorithmen immer als membrandurchspannender Bereich ermittelt wurde, jedoch im Vergleich zu den anderen 5 Domänen den niedrigsten Wert erzielte.

A. Polycystin-2 ist ein Protein mit 6 Transmembrandomänen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Topologie von Polycystin-2 mittels einer recht häufig verwendeten, auf der Verwendung von C-terminalen Deletions-Fusionskonstrukten basierenden Methode aufgeklärt (Taylor et al., 2000; Nims et al. 2003; Tie et al., 2005; Milenkovic et al., 2007). Hierzu wurde Polycystin-2 in den jeweiligen 5 postulierten Schleifendomänen abgeschnitten und C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert (vgl. Abb. 5). Immunzytochemische Analysen auf der Basis von membranselektiver Permeabilisierung und sog. Protease-protection-Assays sollten dabei die Ausrichtung des Epitops und der damit verbundenen Schleifenregion lokalisieren. So führten beide Techniken zu übereinstimmenden Ergebnissen bezüglich der ER-luminalen Ausrichtung von Schleifendomäne eins, drei und fünf bzw. der zytoplasmatischen Ausrichtung des N- und C-Terminus sowie der Schleifendomänen zwei und vier (vgl. 3.1). Die ER-luminale Ausrichtung der ersten Schleifendomäne konnte dabei zusätzlich durch den Nachweis der N-Glykosylierung des ungespaltenen bzw. des geschützten Spaltfragmentes von PC2 Schleife 1-HA bestätigt werden. Die

Glykosylierungsdaten im Bezug auf PC2 Schleife 1-HA stehen in Einklang zu der von Mochizuki et al. (1996) geforderten vornehmlichen *N*-Glykosylierung von Polycystin-2 in der ersten Schleifendomäne. Zusammenfassend ist demnach festzuhalten, dass das von Mochizuki et al. (1996) vorgeschlagene Topologie-Modell bestätigt werden konnte, wobei die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Daten sogar noch zusätzliche, ergänzende Informationen zu dem publizierten Modell liefern.

Bei dem Proteinase K-Assay für PC2 Schleife 3-HA war ein Spaltprodukt zu beobachten, das aufgrund seiner Größe (~40 kDa) wohl durch vornehmliche Spaltung im N-Terminus der Schleifenmutante entstanden sein muss. Die Koexistenz eines nach der Modellvorstellung richtig gefalteten Proteinproduktes von PC2 Schleife 3-HA und eines Proteinproduktes mit einer Fehlinsertion von Transmembrandomäne 2 und 3 kann kaum der Grund für das zeitgleiche Auftreten des 40 kDa großen Fragmentes und des nach Datenbankrecherchen zu erwartenden geschützten Fragmentes (zwischen 6,7 und 8,1 kDa) beim Verdau von PC2 Schleife 3-HA sein. So konnte das 40-kDa-Fragment durch eine Erhöhung der Proteinase K-Konzentration auf das vierfache fast vollständig eliminiert werden. Da nach Hubbard (1998) die Tertiärstruktur eines nativen Proteins vor allem für die Hydrolyseaktivität von Proteasen mit sog. breiten Spezifitäten wie Proteinase K eine wichtige Rolle spielt, könnten die Daten aus dem genannten Protease-Assay demnach ein Hinweis darauf sein, dass die zweite Schleifendomäne strukturell gesehen relativ eng an der Membran anliegt und sich somit weitgehend einem Proteinase K-Zugriff entzieht. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass eine Erhöhung der Proteinase-Menge beim Verdau von PC2 Schleife 3-HA die Wahrscheinlichkeit für das Enzym erhöht haben muss, weiter C-terminal in Schleifendomäne 2 schneiden zu können, da eine N-terminal verkürzte Version des eigentlich geschützten Fragmentes freigesetzt wurde (die Calreticulin-Kontrollen gewährleisten, dass keine Penetration der Mikrosomenmembran vorlag, vgl. auch Abb. 19). Weiterhin ist anzumerken, dass Schleifendomäne 2 mit knapp 16 Aminosäuren die kleinste Schleifenregion von Polycystin-2 repräsentiert. Ein an die zweite Schleife gebundenes, zytoplasmatisches Protein als Grund für die sterische Hinderung bei der Spaltung erscheint eher unwahrscheinlich, da dieses durch Zugabe von Proteinase K zu den unpermeabilisierten Mikrosomen vermutlich bereits verdaut worden wäre und da 14 der 15 bisher für PC2 identifizierten Bindepartner im N- und vor allem im C-Terminus des Proteins binden (nur Hax-1 bindet in Schleifendomäne 5; vgl. 1.6).

Im Bezug auf die divergierenden Meinungen über den zu Transmembrandomäne 4 zugehörigen Sequenzbereich (vgl. Abb. 4) lieferten die membranselektiven Immunzytochemie-Studien den Hinweis, dass nicht wie angenommen die Aminosäuren 559 bis 577 das Segment bilden (Mochizuki et al., 1996), sondern eher die von der Swissprot-Datenbank angegebenen Aminosäuren 551 und 571 die äußeren Grenzen darstellen. So konnte das C-terminale HA-Epitop von PC2-Varianten, die nach Aminosäure 577-573 abgeschnitten waren, bereits nach Digitonin-Permeabilisierung detektiert werden (vgl. 3.2.2). Da mit 5 µg/ml Digitonin die ER-Membran nachweislich nicht permeabilisiert wird (vgl. 3.1.1.A), muss davon ausgegangen werden, dass der genannte Aminosäurebereich damit zytoplasmatisch exponiert liegt, was vermuten lässt, dass die C-terminale Begrenzung von Transmembrandomäne 4 wohl eher bei Aminosäure 571 liegt. Da Transmembrandomänen in der Regel mindestens 20 Aminosäuren umfassen (Karlson et al., 1994), erscheint somit Aminosäure 551 als N-terminale Grenze für das vierte Transmembransegment am wahrscheinlichsten.

B. Alle Methoden zur Aufklärung der Topologie von Membranproteinen beruhen auf der Modifikation der entsprechenden Proteine

Um ein vorausgesagtes Topologie-Modell zu verifizieren, standen prinzipiell 2 Methoden zur Verfügung. So besteht die Möglichkeit, mit dem Volllängen-Protein zu arbeiten, oder sog. C-terminale Deletions-Fusionskonstrukte herzustellen (van Geest und Lolkema, 2000), wie sie im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Die zuerst genannte Methode wird in der Regel bevorzugt, da hier mit dem vollständig translatierten Protein gearbeitet wird. Ein solcher Ansatz wurde im Rahmen von Vorarbeiten zu diesem Projekt bereits verfolgt. Dabei handelte es sich um einen sog. Glykosylierungs-scanning-Assay (van Geest und Lolkema, 2000), bei dem nach Entfernen sämtlicher nativer Glykosylierungsstellen künstliche Glykosylierungsstellen in die vorausgesagten Schleifenregionen eingeführt wurden. Aufgrund der Instabilität von Polycystin-2 nach Entfernen der endogenen Glykosylierungsstellen (pers. Mitteilung Prof. Dr. Witzgall) wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt. Da N- und O-Glykosylierung als Stabilisierungsfaktor sowohl für sezernierte Proteine als auch für Membranproteine gelten, kann eine Inhibierung der Glykosylierung zu Fehlfaltung, Aktivitätseinbußen und Instabilität führen (Lodish et al., 1996). Sämtliche weitere Methoden, die auf der künstlichen Einführung von chemisch bzw. enzymatisch modifizierbaren Sequenzen, Antikörper-Epitopen oder Spaltsequenzen beruhen, führen ebenfalls recht häufig

zu instabilen bzw. funktionell inaktiven Proteinen, weil vermutlich die native Proteinstruktur zu sehr verändert wird (Lin et al., 1999; Lewis et al., 2001; Hong et al., 2007). Da bisher nur wenig darüber bekannt ist, wie Transmembransegmente in die Membran inserieren (Singer, 1990; Zen et al., 1995; Nilsson et al., 2000; von Heijne, 2006), kann es gut möglich sein, dass durch die genannten Proteinmodifikationen sog. topogene Signale verändert bzw. zerstört werden (Dewji et al., 2004).

Am besten wäre es daher, die Topologie am Wildtyp-Protein über die Zugänglichkeit bzw. Unzugänglichkeit von Antikörpern zu klären, die gegen die postulierten Schleifendomänen des Proteins selbst gerichtet sind. Dieser Gedanke konnte im Rahmen dieser Topologie-Studien zum Teil umgesetzt werden, indem Antikörper gegen den N-Terminus und die erste Schleifendomäne zur Anwendung kamen. Jedoch stellt die Generierung von spezifischen Antikörpern einen hohen Zeit- und Kostenaufwand dar, wobei viele Antikörper letztlich nur für eine limitierte Anzahl an Techniken einsetzbar sind. Eine weitere Alternative zur Topologie-Bestimmung stellten daher die sog. C-terminalen Deletions-Fusionskonstrukte dar, die für die Topologie-Studien in dieser Arbeit verwendet wurden. Da auch diese Methode letztlich auf der Modifizierung von Proteinen beruht, werden auch entsprechende Vorbehalte entgegengebracht. Das in der gängigen Literatur aufgeführte Hauptargument ist, dass durch die Verkürzungen die Integration der N-terminal von der Deletion gelegenen Transmembransegmente beeinflusst wird, da durch die genannten Protein-Modifikationen sog. topogene Signale entfernt werden (Dewji et al., 2003) bzw. weiter C-terminale Transmembransegmente für die Membran-Inserierung fehlen (Turk und Wright, 1997; Zhang et al., 1998; Joyce et al., 2000; Meindl-Beinker et al., 2006). So wird weiterhin spekuliert, ob die angehängten Reportergruppen nicht auch die Inserierung von Transmembransegmenten forcieren oder blockieren könnten (Joyce et al., 2000).

Ein Argument gegen diese Einwände stellen die übereinstimmenden Daten aus den Protease-protection-Assays und den membranselektiven Immunzytochemie-Studien dar. So lieferte der Nachweis von geschützten Fragmenten im erwarteten Größenbereich bei den Protease-Assays für PC2 Schleife 1-HA, PC2 Schleife 3-HA und PC2 Schleife 5-HA nicht nur Informationen über die subzelluläre Lage des Bereiches C-terminal der Transmembransegmente 1, 3 und 5, sondern auch über den Bereich N-terminal davon (vgl. 3.1.1.B). Die hieraus zu folgernde zytoplasmatische Ausrichtung des N-Terminus und der Schleifendomänen zwei und vier konnte wiederum mit Hilfe der immunzytochemischen Experimente für das Vollängen-

protein und PC2 Schleife 2-HA bzw. PC2 Schleife 4-HA bestätigt werden, wobei für die beiden letzteren wiederum auch Protease-Assays deren zytoplasmatische Lokalisierung bestätigten (vgl. 3.1.1.A und B). Ein weiteres Gegenargument liefert der Befund, dass die Zugabe eines gegen die Schleifendomäne 5 (bildet vermutlich die Porenregion des Kanals) von Maus-Polycystin-2 [966 Aminosäuren lang und zu 95% homolog zu humanem PC2; vgl. auch Pennekamp et al. (1998)] gerichteten Antikörpers in das Medium von embryonalen Maus-Sammelrohr-Zellen den flussinduzierten Calcium-Influx bei diesen Zellen unterbindet, der vermutlich durch einen funktionellen Komplex aus Polycystin-1 und Polycystin-2 in der Membran von Zilien vermittelt wird (Nauli et al., 2003). Dies bestätigt die mittels PC2 Schleife 5-HA postulierte ER-luminale bzw. extrazelluläre Ausrichtung von Schleifendomäne 5 (vgl. 3.1.1.A und B). Ein weiterer Einwand gegen die weiter oben angeführten Vorbehalte wird auch durch den Befund geliefert, dass plasmamembranständige Polycystin-2-Varianten, die in Schleifendomäne 4 nach Aminosäure 577 und weiter C-terminal davon abgeschnitten waren, bei unpermeabilisierten Zellen durch einen gegen den Aminosäurebereich 331-343 (Schleifendomäne 1) von PC2 gerichteten Antikörper immunzytochemisch detektierbar waren (vgl. 3.2.2), wobei es völlig unerheblich war, ob die in Schleife 4 abgeschnittenen Proteine C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert waren oder nicht. Auf diese Weise konnte erneut die mit Hilfe von PC2 Schleife 1-HA nahegelegte extrazelluläre bzw. ER-luminale Ausrichtung der ersten Schleifendomäne bestätigt werden. Weiterhin ist anzuführen, dass die durch den Protease-protection-Assay bei PC2 Schleife 1-HA proklamierte Ausrichtung des N-Terminus nicht nur durch den auf membranselektiver Permeabilisierung beruhenden immunzytochemischen Nachweis bei PC2 fl-HA (ER-Lokalisierung), sondern auch durch Daten von Cai et al. (1999) bestätigt werden, die besagen, dass der N-Terminus bei einer plasmamembranständigen, (weitestgehend C-terminal abgeschnittenen) HA-markierten Variante von Polycystin-2 [PC2(1/741)HA] erst nach Triton-Permeabilisierung immunzytochemisch detektierbar ist (vgl. 3.1.1.A).

Demnach scheinen die Vorbehalte gegenüber C-terminalen Deletionen und hydrophilen Reportergruppen im Hinblick auf die Beeinflussung der nativen Topologie im Falle der für die jetzigen Studien verwendeten Konstrukte unbegründet zu sein. In diesem Zusammenhang ist weiterhin anzumerken, dass bisher keine Studie veröffentlicht wurde, die eindeutig eine Beeinflussung der Topologie von Membranproteinen durch angehängte, hydrophile Reporter-Gruppen nachweist (vgl. auch Nakai et al., 1999). Dies wird auch durch den Befund unterstrichen, dass die Fusion eines HA-Epitops an den C-Terminus des Volllängenproteins

nichts an dessen allseits postulierten, zytoplasmatischen Ausrichtung (vgl. 3.1.1) änderte, die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines immunzytochemischen Assays nachvollzogen werden konnte (3.1.1.A). Die weiter oben angeführten Daten sprechen ebenfalls dafür, dass die im Verlauf der Topologie-Studien dokumentierten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der Schleifenmutanten nicht auf eine veränderte Topologie infolge der angehängten Reporter-moleküle oder der C-terminalen Deletionen zurückzuführen sind. Dies konnte durch die Detektion eines plasmamembranspezifischen Exportmotivs in Schleifendomäne 4 bestätigt werden (vgl. 3.2; 4.2.3).

C. Ausblick

Polycystin-2 repräsentiert ein Beispiel dafür, dass topologische Informationen helfen können, Rückschlüsse auf die Funktion eines Membranproteins zu ziehen. So wurde anhand von Sequenzhomologien und des auf Hydrophobizitäts-Plots basierenden 6 Transmembrandomänen-Modells eine Homologie zwischen Polycystin-2 und spannungsabhängigen Ca^{2+} ($\text{VACC}\alpha_{1E-1}$)- oder Na^+ -Kanalproteinen (Mochizuki et al., 1996) bzw. TRP-Kanälen (Tsiokas et al., 1999; Cantiello, 2004) festgestellt. Somit lag bereits sehr früh eine Funktion von Polycystin-2 als Kationen-Kanal auf der Hand, was später durch Vassilev et al. (2001), Koulen et al. (2002), Luo et al. (2003) und andere bestätigt werden konnte. Weiterhin können die über Polycystin-2 im Rahmen der Arbeit gewonnenen, topologischen Informationen helfen, die Topologie von natürlichen bzw. pathologischen Spleißvarianten (Reynolds et al., 1999; Hackmann et al., 2005) oder von fehlgefalteten bzw. verkürzten Mutationsformen (Veldhuisen et al., 1997; Magistroni et al., 2003) von Polycystin-2 besser zu beurteilen. Dies wiederum könnte eventuell dafür nützlich sein, Rückschlüsse auf funktionell wichtige Domänen des Proteins zu ziehen. Schlussendlich stellen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Topologie von Polycystin-2 die Basis für Medikamentenentwicklungen dar, die helfen könnten, falsch lokalisierte bzw. dysregulierte Mutationsformen von PC2 ihrer Funktion zu berauben, indem Mittel entwickelt werden, die funktionell wichtige, zytoplasmatisch oder extrazellulär exponierte Bereiche blockieren.

4.1.2 Strukturelle Charakterisierung von Polycystin-2 über NMR

Die strukturelle Charakterisierung von Polycystin-2 umfasste neben den Topologie-Studien auch die NMR-Analyse.

A. NMR-Analysen für den C-Terminus von Polycystin-2

Für die NMR-Struktur-Analyse wurde der C-Terminus des PC2-Proteins gewählt. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten der 15 Interaktionspartner von Polycystin-2 mit dieser Domäne wechselwirken und aufgrund der Präsenz von strukturellen und funktionellen Elementen in diesem Proteinabschnitt erschien dieser Bereich von PC2 lohnenswert für eine Strukturbestimmung (vgl. auch 3.4). Um die Analyse der ~33 kDa großen Proteindomäne zu erleichtern, wurde diese zweigeteilt, wobei ein Fragment die Aminosäuren 680 bis 796 [pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796)] und das andere Fragment den Aminosäurebereich 797 bis 968 [pET47b/PKD2(797-968)] umfasste. Im Falle des größeren der beiden rekombinant hergestellten C-terminalen Fragmente von PC2 zeigten HSQC-Spektren mit ¹⁵N-markiertem Protein, dass sich die meisten Aminosäuresignale im mittleren Bereich des Spektrums konzentrierten, was darauf hindeutet, dass das Protein größtenteils unstrukturiert vorliegt. NMR-Diffusionsmessungen und Gelfiltrationsstudien zeigten weiterhin, dass das Protein in oligomeren Strukturen organisiert ist, was eventuell mit ein Grund dafür ist, dass nur etwa 132 der insgesamt 190 erwarteten Aminosäuresignale gezählt werden konnten (vgl. auch 3.4.2.A). Der Versuch, den minimalen, für die homomere Interaktion benötigten Aminosäureabschnitt des Peptides über einen Trypsinverdau zu ermitteln, ergaben ein ungefähr 7,7 kDa großes Fragment, das nach Sequenzierungsdaten zu urteilen den Aminosäurebereich 828-900 umfasst. So bestand die Hoffnung, durch die reduzierte Anzahl an Aminosäuren die Auflösung im Spektrum zu verbessern. Immunpräzipitationsstudien mit einem solchen verkürzten, C-terminalen PC2-Peptid (AS 828-900) zeigten jedoch, dass dieses nicht mehr mit dem ~33 kDa großen Vollängen-C-Terminus von PC2 (AS 680-968) wechselwirken kann. Da über die Gründe für die widersprüchlichen Resultate der Immunpräzipitationsstudien und des Trypsinverdaus nur spekuliert werden kann, wurde die Strukturaufklärung des die C-terminalen Aminosäuren 797-968 umfassenden Fragmentes nicht weiterverfolgt. Letztlich kann aber den NMR-Studien zufolge ausgesagt werden, dass die N-terminale Begrenzung für die homomere Interaktion von Polycystin-2 nicht bei Aminosäure 742, sondern erst bei Aminosäure 797 (oder weiter C-terminal davon) zu liegen scheint. Dies impliziert, dass ähnlich wie bei Polycystin-1 die Coiled-coil-Domäne (AS 763-793) nicht an der Selbst-Interaktion beteiligt zu sein scheint (vgl. Tsiokas et al., 1997).

Für das kleinere der beiden C-terminalen Fragmente konnte über die Ermittlung des „chemical shift index (CSI)“ für Kohlenstoff gezeigt werden, dass dieses gemäß den Sekundärstrukturvorhersagen größtenteils in Form von α -Helices vorliegt (vgl. auch 3.4.2.B). So stimmen die NMR-Struktur-Analyse und das Vorhersage-Programm darin überein, dass im Bereich von Aminosäure 723-783 (vgl. auch Abb. 47 und 55) ein paarweise angeordnetes Helix-Loop-Helix-Motiv liegt, wobei das weiter C-terminal gelegene Helix-Loop-Helix-Motiv (AS ~753-783 in Abb. 55) ziemlich genau mit der nach Strukturvorhersagen als EF-Hand deklarierten Domäne (AS 754-782) zusammenfällt. Die Struktur-Analyse konnte jedoch nur in Gegenwart von Calcium durchgeführt werden, da der größte Teil des Proteins in Abwesenheit des zweiwertigen Ions unstrukturiert vorzuliegen scheint. Die massive Strukturierung des Peptides, die mit der Zugabe von Calcium einherging, ähnelt Befunden über Calcium-bindende Proteine wie z.B. TnC, CaVP oder Calerythrin. Diese Proteine werden als sog. strukturelle EF-Hand-Proteine bezeichnet, da Calcium für die strukturelle Integrität dieser Proteine wichtig sein soll (Theret et al., 2000; Aitio et al., 2001; Li et al., 1994). So zeigen *in vitro* Experimente, dass die genannten Proteine, ähnlich wie das kleinere C-terminale Fragment von PC2, in Abwesenheit von Calcium ungefaltet vorliegen und erst in Gegenwart des Ions von der „random-coil“ Struktur in die Helix-Loop-Helix-Konformation übergehen, was man auch mit einer *de novo* Strukturierung der Proteine durch Calcium beschreibt (Gifford et al., 2007).

Dieser Aspekt korreliert mit 1D-Protonen-Spektren, die für das kleinere der beiden C-terminalen Fragmente von Polycystin-2 ermittelt wurden. Diese sagen aus, dass im Aminosäurebereich des Helix-Loop-Helix-Paares (AS 723-783; vgl. auch Abb. 58) durch Zugabe von Calcium auffällige strukturelle Veränderungen stattfinden. So waren beispielsweise eine deutliche Änderung der chemischen Verschiebung an Aminosäureposition D79 (= AS 752 in PC2: zweites Helix-Loop-Helix-Motiv des Paares) bzw. der Signalintensität an Aminosäureposition F65 (= AS 738 in PC2: erstes Helix-Loop-Helix-Motiv des Paares) zu beobachten, wenn das Ion in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben wurde (vgl. auch 3.4.2.B). Vergleichbare Beobachtungen konnten auch noch für die Aminosäuren Y89 (= AS 762 in PC2) und Q95 (= AS 768 in PC2) aus dem zweiten Helix-Loop-Helix-Motiv des Paares gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass die mit der Calciumzugabe einhergehenden Strukturänderungen Aminosäuren aus den beiden paarweise angeordneten Helix-Loop-Helix-Motiven erfassen, sprechen dafür, dass das paarweise angeordnete Helix-Loop-Helix-Motiv ein sog. EF-Hand-Paar darstellt. Diese Daten

korrelieren mit dem Befund, dass EF-Hände in der Regel paarweise auftreten (Gifford et al., 2007).

B. Ausblick

Um abschließend die Struktur für das kleinere der beiden C-terminalen Fragmente von Polycystin-2 zu bestimmen, wurde dieses mit ^2H , ^{15}N und ^{13}C markiert. Die sequentielle Zuordnung und letztlich die dreidimensionale Strukturbestimmung für dieses Peptid konnten allerdings vor Beendigung dieser Doktorarbeit nicht mehr zu einem Abschluss gebracht werden. Ein weiterer Teil der strukturellen Charakterisierung dieses Peptides liegt auch in der Bestimmung der für die Calcium-Koordination elementaren Aminosäuren des Helix-Loop-Helix-Paares. Die hierfür notwendigen sog. Mangan-Experimente sind bereits in Arbeit. Mn^{2+} -Ionen sind paramagnetisch und beeinflussen so das Relaxationsverhalten von Atomkernen (^1H) in räumlicher Nähe des Mangans, die dadurch an Intensität verlieren, bzw. verschwinden. Werden Mangan-Ionen z.B. zu einer Lösung von Ca^{2+} -gesättigtem PC2 gegeben, wird es dieses teilweise aus der Bindestelle der EF-Hand verdrängen und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen beiden Ionen ein. Durch die partielle Besetzung der Bindestellen mit Mangan-Ionen werden die NMR-Signale der koordinierenden Aminosäureseitenketten und die benachbarter Aminosäuren ausgelöscht. Dies wiederum liefert wichtige strukturelle Informationen zur Lokalisierung der Ca^{2+} -Bindestellen im Protein.

Im Falle des größeren C-terminalen Fragmentes könnte versucht werden, N- und C-terminal verkürzte Versionen des ursprünglich verwendeten Expressionkonstruktes aufzureinigen und auf homomere Interaktionsfähigkeit zu überprüfen. Im Anschluss könnte dann versucht werden, von diesem Peptid die Struktur mittels NMR zu ermitteln. Allerdings fehlt dann immer noch die Struktur der Bereiche N- und C-terminal von dieser Interaktionsdomäne, so dass wieder neue Expressionskonstrukte konzipiert und etabliert werden müssten, was natürlich auch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist. Daher sollte wohl über Alternativen zur Strukturbestimmung mittels NMR wie zum Beispiel Röntgenstrukturanalyse nachgedacht werden. In diesem Fall würde sich dann allerdings gleich die Expression der gesamten 289 C-terminalen Aminosäuren anbieten.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von Polycystin-2

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Publikationen, welche die Funktion von Polycystin-2 als nicht selektivem, spannungsabhängigen Kationen-Kanal belegen (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002; Luo et al., 2003). Um Kanalproteine auf funktioneller Ebene eingehender zu charakterisieren, hilft es beispielsweise Bindungspartner zu identifizieren, da diese möglicherweise die Kanalaktivität regulieren. Für Polycystin-2 sind mittlerweile 15 Bindungspartner identifiziert worden. So sollten im Rahmen dieser Arbeit mittels Fluoreszenzspektroskopie bzw. Quarzmikrowaage-Technik Bindungsparameter für Interaktionen des C-Terminus von Polycystin-2 mit dem C-Terminus von Polycystin-1, PIGEA-14 und Calcium bestimmt werden, da so eine bessere Beurteilung und Charakterisierung der Interaktionen im Hinblick auf ihre physiologische Relevanz möglich wird. Da auch die subzelluläre Lokalisation von Kanalproteinen Einfluss auf deren Aktivität bzw. deren Funktionszustand nehmen kann (Caplan und Muth, 2003), bestand ein weiterer Aspekt dieser Arbeit in der Charakterisierung eines Plasmamembran-Exportmotivs für Polycystin-2.

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung einer EF-Hand-Domäne im C-Terminus von Polycystin-2

Im Bezug auf die funktionelle Charakterisierung des nach Strukturvorhersagen als EF-Hand-Domäne deklarierten Aminosäurebereiches 754-782 (Mochizuki et al., 1996) wurden Calcium-Bindungsstudien mit dem His-freien Proteinprodukt von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) per NMR-Analyse (vgl. auch 3.4.3.B) und per Fluoreszenzspektroskopie (vgl. auch 3.4.3.A) durchgeführt.

A. Calcium-Bindungsstudien mit NMR

Die NMR-Studien ergaben, dass das die Aminosäuren 680-796 umfassende Fragment von Polycystin-2 nicht wie vermutet eine einzelne EF-Hand, sondern vermutlich eine sog. paarweise angeordnete EF-Hand mit unterschiedlich hohen Calcium-Affinitäten der beiden Einheiten besitzt (vgl. auch 3.4.3.B). So traten die infolge der Calcium-Zugabe hervorgerufenen Veränderungen in der Signalintensität eines Phenylalanin-Restes an Position 738 erst bei viel höheren Calcium-Konzentrationen auf als die Veränderungen des

„chemischen Shifts“ der Aminosäure Asparagin an Position 752. Die Auftragung dieser Veränderungen gegen die Gesamtkonzentration an Calcium ergab Bindungskurven mit unterschiedlichen K_d -Werten. Die weiter C-terminal gelegene der beiden EF-Hände scheint dabei mit einer Dissoziationskonstante von $51 \pm 4 \mu\text{M}$ etwas höher affin für Calcium zu sein als die weiter N-terminal gelegene EF-Hand mit einer Dissoziationskonstante von $161 \pm 36 \mu\text{M}$. So setzten die Veränderungen der Signalintensität bei F65 (= AS 738 in PC2) erst bei knapp $100 \mu\text{M}$ Calcium ein, also einer Ligandkonzentration, bei der die Bindungskurve für die höher affine EF-Hand bereits in die Sättigung übergeht (Daten nicht gezeigt). Dies korreliert mit Befunden von Calcium-bindenden Proteinen wie TnC oder CaM, wo die zweite EF-Hand eines solchen Paares in der Regel etwas höher affin ist und somit zuerst mit Calcium gesättigt wird (Li et al., 1995; Li et al., 1997; Gifford et al., 2007). Die Bindung von Calcium an diese EF-Hand ist wiederum die Voraussetzung dafür, dass die niedriger affine EF-Hand mit dem zweiwertigen Ion gefüllt wird. Daher werden die EF-Hand-Paare dieser Proteine auch als sequentiell kooperativ bezeichnet (Gagne et al., 1997; Gifford et al., 2007). Der Aspekt der sequentiell kooperativen Calcium-Bindung bei PC2 steht in Einklang zu dem Ergebnis, dass die Zugabe von Calcium zu einem nach Aminosäure 769 deletierten C-terminalen PC2-Fragment [pET28a Δ T7/PKD2(680-769); vgl. auch 2.1.8.A], also einem Protein, das mitten im Schleifenbereich der zweiten, höher affinen EF-Hand abgeschnitten ist, zu keinerlei auffälligen strukturellen Veränderungen des genannten Peptides im NMR-Spektrum führte. Weiterhin konnten auch dann keinerlei Strukturänderungen im NMR-Spektrum beobachtet werden, wenn Magnesium, ein dem Calcium recht ähnliches zweiwertiges Ion, in einem identischen Konzentrationsbereich von 5 mM zu dem Translationsprodukt von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796) gegeben wurde. Dies spricht dafür, dass es sich bei dem EF-Hand-Paar um sog. Calcium-spezifische EF-Hände handelt, wie sie auch bei Proteinen wie CaM oder Calbindin D_{9K} zu finden sind (Ohki et al., 1997; Andersson et al., 1997). So können die genannten Proteine zwar Magnesium binden (mit K_d -Werten im Millimolarbereich), diese Wechselwirkung führt jedoch zu keinerlei bzw. geringfügigen Konformationsänderungen (Gifford et al., 2007).

B. Calcium-Bindungsstudien mit Fluoreszenzspektroskopie

In den fluoreszenzspektroskopischen Messungen hingegen war keinerlei Hinweis auf zwei Calcium-bindende Motive zu erkennen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass für die spektroskopischen Messungen die Fluoreszenzeigenschaften von Tyrosin-Resten ausgenutzt

wurden, von denen das Proteinprodukt von pET41aΔGST/His-Thrombin-PKD2(680-796) insgesamt drei besitzt. Zwei dieser Tyrosine liegen dabei vor dem als EF-Hand-Paar ausgewiesenen Bereich (AS 684 und 708 in PC2). Das dritte Tyrosin hingegen liegt an Position 762, also mitten in der 2. EF-Hand (genauer: am Übergang zwischen der 1. Helix und der Calcium-bindenden Schleife). Daher kann es gut möglich sein, dass die bei der Calciumtitration zu beobachtende Fluoreszenzabnahme, die letztlich für die K_d -Wertbestimmung herangezogen wurde, ausschließlich auf die Wechselwirkung von Ca^{2+} mit der weiter C-terminal gelegenen EF-Hand zurückzuführen ist und die Calciumbindung der weiter N-terminal gelegenen EF-Hand überhaupt nicht detektiert wurde. Versuche, die K_d -Werte für beide EF-Hände über die Fluoreszenz von zwei endogenen Phenylalanin-Resten zu bestimmen, die an Aminosäure-Position 738 und 759 liegen und somit jeweils in einer der beiden EF-Hand-Motive sitzen, scheiterten, da diese vermutlich aufgrund ihrer geringen Quantenausbeute in Gegenwart der Tyrosine nicht detektierbar waren (Daten nicht gezeigt). Der letztlich über Fluoreszenzspektroskopie ermittelte K_d -Wert bewegt sich zwischen 70-90 μM und liegt somit im Größenbereich des per NMR bestimmten K_d -Wertes für die weiter C-terminal gelegene höher affine EF-Hand.

Die für das EF-Hand-Paar ermittelten K_d -Werte liegen ebenfalls im Rahmen der bisher für verschiedene Calcium-bindende Proteine ermittelten K_d -Werte von 10^{-9} bis 10^{-4} M. Die (im Verlauf des Kooperationsprojektes) ermittelten K_d -Werte sprechen weiterhin dafür, dass es sich bei dem EF-Hand-Paar vermutlich nicht wie nach den NMR-Struktur-Analysen zu vermuten um rein strukturelle EF-Hände (vgl. auch 4.1.2.A) handelt, da diese sich in der Regel durch eine hohe Affinität zu Calcium auszeichnen (K_d -Werte: 10^{-9} bis 10^{-7} M). Dieses Argument wird weiterhin durch den Befund unterstützt, dass die Kanalaktivität von Polycystin-2 durch die Applikation von intrazellulärem Calcium gesteigert werden kann (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002). Ein weiteres Argument gegen eine rein strukturelle EF-Hand bildet auch die ermittelte Calcium-Spezifität. So stellen strukturelle EF-Hände meist sog. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Domänen dar, um die Besetzung durch eines der beiden Ionen in der Zelle sicherzustellen, was wiederum die strukturelle Integrität des zugehörigen Proteins garantiert (Zot und Potter, 1982).

C. Ausblick

Um das EF-Hand-Paar auf funktioneller Ebene weiter zu charakterisieren, stehen eine Reihe von möglichen Experimenten zur Verfügung. So wäre es interessant zu untersuchen, welche Aminosäuren in den jeweiligen Schleifenregionen in die Koordination des Calciums involviert sind. Um diese Frage zu klären, laufen bereits sog. Mangan-Titrationsversuche mit dem His-freien Proteinprodukt von pET41a Δ GST/His-Thrombin-PKD2(680-796). Außerdem wäre es lohnenswert zu klären, ob das EF-Hand-Paar nach der Calcium-Bindung eine Homo- oder Heterodimerisierung des C-Terminus von PC2 induziert, wie sie beispielsweise von Calcium-bindenden Proteinen wie CaM oder TnC bekannt sind (Reid, 1990; Shaw et al., 1990). Hierzu müsste dann allerdings ein die gesamten 289 Aminosäuren umfassendes Expressionskonstrukt herangezogen werden, da dieses den EF-Handbereich sowie die nötigen Interaktionsdomänen für die Homo- bzw. Heterodimerisierung beinhaltet. Um die Frage zu klären, ob das EF-Hand-Paar tatsächlich eine regulierende Funktion für die Kanalaktivität hat, könnten schließlich Missense-Mutationen in funktionell wichtige Bereiche der EF-Hände des Wildtyp-Proteins eingeführt werden (es gibt keine Missense-Mutationen in diesem Aminosäurebereich im humanen System, nur Nonsense-Mutationen). Im Anschluss sollten dann Calcium-Titrations in Verbindung mit Patch clamp-Versuchen für diese Mutanten endgültig Klarheit bringen.

4.2.2 Interaktionsstudien mit der Quarzmikrowaage

Die Interaktionsstudien von Polycystin-2 mit Polycystin-1 und PIGEA-14 sollten über die sog. Quarzmikrowaage-technik (QCM) durchgeführt werden.

A. Methoden zur Immobilisierung von Proteinen auf Schwingquarzen

Um die thermodynamischen Bindungsparameter der Interaktionen zwischen dem C-Terminus von PC2 und PIGEA-14 bzw. dem C-Terminus von PC1 über QCM zu messen, wurde die Strategie verfolgt, die Bindungspartner mit Hilfe eines C-terminalen His-Epitops an der Waage zu immobilisieren. Im nächsten Schritt sollte dann der C-Terminus von Polycystin-2 in das System eingebracht werden.

So gibt es zunächst die Möglichkeit, Proteine über Van der Waals Kräfte oder elektrostatische Wechselwirkungen zu immobilisieren (Dorn et al., 1998, Liu et al., 2001). Diese Fixierungsmethoden reagieren jedoch sehr sensitiv auf Parameter wie Ionenstärke, pH oder Temperatur, so dass es häufig zu einer ungeordneten Orientierung der immobilisierten Proteine sowie zu deren Funktionsverlust kommen kann (Dorn et al., 1998). Auch können für die Interaktion wichtige Bereiche maskiert werden. Diese Probleme werden zum Teil auch bei der kovalenten Bindung von Proteinen beobachtet, die über die Wechselwirkung von oberflächlich exponierten Aminosäureresten des Proteins mit reaktiven Oberflächen vermittelt wird (Gershon und Khilko, 1995). Die hohe Affinität zwischen Biotin und Streptavidin kann ebenfalls zur Immobilisierung verwendet werden (Ahlers et al., 1990). Der Nachteil dieser Methode liegt aber in der relativ unspezifischen Biotinylierung von Proteinen, die sich unter anderem negativ auf die Interaktion mit dem Bindungspartner auswirken kann. Dieses Problem kann zwar durch Biotin-Epitope umgangen werden, diese sind jedoch deutlich weniger affin gegenüber Streptavidin (Schmidt et al., 1996; Hengsakul und Cass, 1997). Die beste und bisher am häufigsten verwendete Methode zur Immobilisierung von Proteinen stellen immer noch die „Metall-chelierenden Lipide“ dar, die im Rahmen des Kooperationsprojektes zur Anwendung kamen (vgl. auch Bosk, 2007). So wird die Funktionalität des über das His-Epitop immobilisierten Proteins in den meisten Fällen bewahrt, was sich bei den Messungen darin widerspiegelte, dass für beide immobilisierten, His-markierten Proteine eine Interaktion mit dem C-Terminus von Polycystin-2 gezeigt werden konnte (Bosk, 2007), wie sie bereits zuvor von Tsiokas et al. (1997), Qian et al. (1997) und Hidaka et al. (2004) mit Hilfe von Zwei-Hybrid-Assays in der Hefe und anderen *in vitro* Assays (durchgeführt mit anderen Aufreinigungsepitopen als den in dieser Studie verwendeten) demonstriert wurde. Außerdem liegen die Proteine bei dieser Immobilisierungsform im Vergleich zu den vorher erwähnten Techniken in einer einheitlichen Orientierung vor. Die laterale Beweglichkeit der Lipide ahmt zudem Prozesse an oder in biologischen Membranen nach, was wiederum den physiologischen Aspekt dieser Messungen unterstreicht (Dorn et al., 1998). Weiterhin ist zu erwähnen, dass trotz einer recht geringen Dissoziationskonstante von etwa 3 μM (Dorn et al., 1998) kinetisch stabile Immobilisierungen von Proteinen an Chelator-Lipiden von mehr als 60 Minuten berichtet wurden, wodurch sich diese Methode besonders für bioanalytische Studien eignet (Gershon und Khilko, 1995; Gritsch et al., 1995; Sigal et al., 1996). So konnte gezeigt werden, dass sich bei den Spülvorgängen die Resonanzfrequenz nur um etwa 4 Hz (C-Terminus von PC1) bzw.

6 Hz (PIGEA-14) änderte, was mit der Entfernung von ungebundenem bzw. unspezifisch gebundenem Protein zu erklären ist (vgl. Bosk, 2007).

B. Aspekte zur Etablierung der Quarzmikrowaage-Messungen

Im Verlauf von Vorexperimenten wurde eine unspezifische Wechselwirkung des C-Terminus (AS 680-968) von Polycystin-2 sowohl mit Ni-IDA Agarose (vgl. auch 3.3.2.D) als auch mit OT-DOPC/DOGS-NTA-Ni Doppelschichten (vgl. Bosk, 2007) beobachtet. Dieser Befund steht in Einklang zu der Aussage, dass vor allem Komplex-bildende Aminosäuren wie Histidin mit Ni-Sepharose (Sepharose ist eine spezielle Form von Agarose) oder „chelierenden Lipiden“ interagieren können, wenn die entsprechenden Aminosäurereste an der Proteinoberfläche exponiert sind (Amersham Pharmacia Biotech, 2001; Shnek et al., 1994). An der unspezifischen Wechselwirkung von Polycystin-2 mit Nickel-Ionen muss auf jeden Fall mehr als ein Histidin-Rest im C-Terminus des Proteins beteiligt sein, da sowohl bei einem den Aminosäurebereich 680-796 umfassenden Fragment (H709, H750, H773, H775 und H793), als auch bei einem den Aminosäureabschnitt 797-968 umfassenden Fragment (H822, H851, H901, H927 und H967) von Polycystin-2 Interaktionen mit Nickel-Ionen festgestellt wurden (vgl. 3.4.1.A und B). Da die Strukturaufklärung des C-Terminus von PC2 über NMR noch nicht abgeschlossen ist, kann jedoch noch keine Aussage über die Position der an der Bindung beteiligten Histidin-Reste gemacht werden. Eine Umkehr des Meßsystems, also die Immobilisierung von His-markiertem PC2C zur Umgehung des Problems erschien wenig sinnvoll, da aufgrund der unspezifischen Interaktionen nicht davon ausgegangen werden kann, dass alle Proteine in derselben Orientierung immobilisiert werden, ein Aspekt, der für eine adäquate Auswertung der Daten jedoch zwingend notwendig ist. Diese Strategie musste aber auch aus einem weiteren Grund verworfen werden, da die mit GST-fusionierten Bindungspartner nicht sauber von der Säule eluierten, was auf Degradierung bzw. unvollständige Translation der Proteine zurückzuführen war (vgl. auch 3.3.2). Um trotz der unspezifischen Wechselwirkung des C-Terminus von PC2 mit Nickel-Ionen die Vorzüge der „Metall-chelierenden Lipide“ (vgl. 4.2.2.A) zu nutzen, wurde zunächst versucht, das Protein in Anwesenheit eines Kompetitors wie Imidazol auf die Quarzmikrowaage zu geben. Es zeigte sich jedoch, dass Imidazol in Konzentrationen von 100 mM und höher eingesetzt werden müsste und damit die Immobilisierung von PC1C oder PIGE A-14 gefährden würde.

Daher wurde die Strategie verfolgt, die Membran vor Zugabe des C-Terminus von PC2 mit dem jeweiligen Bindungspartner soweit abzusättigen, dass keinerlei unspezifischen Wechselwirkungen mehr möglich sind. So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des C-terminalen Fragmentes von Polycystin-2 zu keinerlei Frequenzabsenkung führt, wenn die Lipiddoppelschicht vorher mit einem His-fusionierten Protein wie Ezrin vollständig belegt wurde. Dieses Protein besitzt zwar im Gegensatz zu dem zunächst als Kontrollprotein ausgewählten Translationsprodukt von pET21b/CLIM1 kein T7-Epitop, die unterschiedlichen K_d -Werte, die im Rahmen der Messungen für die Interaktionen zwischen PC2C und PIGEA-14 bzw. PC1C ermittelt wurden, sprechen jedoch dafür, dass die gezeigten Wechselwirkungen wohl nicht auf Wechselwirkungen des C-Terminus von PC2 mit dem 11 Aminosäuren umfassenden T7-Epitop zurückzuführen sind und somit rein spezifischer Natur sind. Nichtsdestotrotz wird bereits an der Klonierung eines neuen Kontrollproteins mit N-terminalem T7-Epitop und C-terminalem His-Epitop gearbeitet, um die Quarzmikrowaagemessungen zu komplettieren.

C. Interaktion von Polycystin-2 mit Polycystin-1 und PIGEA14

Wie bereits erwähnt, konnten im Verlauf der Quarzmikrowaagemessungen die für den C-Terminus von PC1 bzw. PIGEA-14 publizierten Interaktionen mit dem C-Terminus von Polycystin-2 (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997; Hidaka et al., 2004) bestätigt werden. Im Falle der Wechselwirkung von Polycystin-2 mit Polycystin-1 konnte sogar gezeigt werden, dass die Interaktion zu 100% reversibel ist. So konnte durch einen Spülvorgang mit Protein-freiem Puffer nach der erfolgten PC2C-Bindung die Resonanzfrequenz auf das Niveau vor Zugabe von PC2C gebracht werden. Daher wurde für die Interaktion von Polycystin-1 mit Polycystin-2 auch ein Alternativ-Weg zur Bestimmung des K_d -Wertes eingeschlagen. Über die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Datenpunkte der Desorption wurde zunächst der k_{off} -Wert mit $(3,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt (Bosk, 2007). Nach der unter 2.2.4.K gezeigten Gleichung kann dann der k_{on} -Wert ermittelt werden, wobei sich dann aus dem Quotienten von k_{on} und k_{off} ein K_d -Wert von 5,45 nM ergibt (Bosk, 2007). Dieser K_d -Wert ist etwa 10 mal kleiner als derjenige, der aus den Gleichgewichtsfrequenzänderungen als Funktion der Proteinkonzentration (vgl. auch 3.3.3.A) bestimmt wurde (46 ± 13 nM). Der über die Anpassung einer Langmuir-Isotherme ermittelte Wert muss aber wohl als der verlässlichere der beiden Werte angesehen werden, da die Modellierung der kinetischen Daten vermutlich aufgrund von kooperativen Effekten zwischen den Proteinen Fehler in sich birgt (pers.

Mitteilung Prof. Dr. C. Steinem). So zeigte die Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Datenpunkte der Desorption je nach Festlegung einzelner Parameter entweder im Anfangsbereich der Kurve oder im weiteren Kurvenverlauf deutliche Abweichungen von den Messwerten (Bosk, 2007). Um verlässliche Werte für k_{on} bzw. k_{off} aus einer Auftragung von k_s gegen c zu erhalten, konnten jedoch sowohl bei den Bindungsstudien zwischen PC1 und PC2 als auch bei denjenigen zwischen PC2 und PIGEA-14 nicht genügend Datenpunkte gesammelt werden.

Da sich der für die Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 mit 46 ± 13 nM ermittelte K_d -Wert im nM-Bereich bewegt, kann man ihn als stark bezeichnen (Wink, 2006; Rehm, 2006), was auf die physiologische Relevanz dieser Interaktion schließen lässt. Der relativ große Fehler bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante könnte neben Fehlern bei der Proteinbestimmung vermutlich vor allem auf Proteindenaturierung zurückzuführen sein, da Dialyseversuche von PC1C gegen den Niedrigsalzpuffer im nachhinein zeigten, dass das Protein nach der Dialyse ein abnormales Verhalten bei der Adsorption an die Waage zeigt (Bosk, 2007). So kann zwar aufgrund der definierten Abstände zwischen den immobilisierten PC1C-Molekülen eine Präzipitation des Proteins im Sinne einer dreidimensionalen Aggregatbildung ausgeschlossen werden, das immobilisierte Protein selbst kann nach dem Umpuffern jedoch trotzdem seiner strukturellen Integrität beraubt sein.

Mit 146 ± 35 nM ist die Dissoziationskonstante für die Wechselwirkung zwischen PIGEA-14 und PC2C nur als ungefähr dreimal schwächer anzusehen (vgl. auch 3.3.3.B). Allerdings muss dieser Wert unter Vorbehalt diskutiert werden, da bei den Bindungsstudien zwischen diesen beiden Proteinen Desorptionsraten zwischen 10-100% erhalten wurden (vgl. auch 3.3.3.B). Ein Grund für diese ungewöhnlichen Beobachtungen könnte ebenfalls in Proteinpräzipitationen liegen. Es könnte durchaus möglich sein, dass ein Komplex aus PIGEA-14 und dem C-Terminus von Polycystin-2 im Gegensatz zu den freien Proteinen zur Präzipitation neigt. Es wäre daher interessant, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Desorptionsrate und dem Zeitraum besteht, der bis zum Einsetzen des Spülvorganges verstrichen ist.

D. Ausblick

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Niedrigsalzbedingungen im Falle von PC1C zu Denaturierungen geführt haben, die wiederum den hohen Messfehler bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante bewirkt haben. Daher wäre trotz der Tatsache, dass dies keinen physiologischen Bedingungen gleichkommt, eine Messung in Hochsalzpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0/500 mM NaCl) zu empfehlen, da das Protein in diesem Puffer stabil war. Da über die Gründe für die Abweichungen bei der Bestimmung der K_d -Werte aus den kinetischen bzw. thermodynamischen Parametern für die Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 nur spekuliert werden kann, sollten die Messungen in Hochsalz eventuell auch Klarheit schaffen (pers. Mitteilung Prof. Dr. Steinem). Diese Maßnahme wäre eventuell auch hilfreich, um das Desorptionsproblem bei der Interaktion zwischen PIGEA-14 und Polycystin-2 in den Griff zu bekommen.

Um die so mittels Quarzmikrowaage ermittelten Bindungsparameter mit einer zweiten Methode zu verifizieren, würde sich die sog. Oberflächenplasmonresonanz-Technik anbieten. Bei dieser Technik ist ebenfalls eine Immobilisierung von His-fusionierten Proteinen an Nickel-Chelat-Oberflächen möglich (Nieba et al., 1997; McDonnell, 2001). Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass diese ebenfalls mit relativ geringen Proteinkonzentrationen auskommt.

4.2.3 Der intrazelluläre Transport von Polycystin-2

In den vergangenen 10-15 Jahren wurden einige Mechanismen aufgedeckt, mit denen Epithel-Zellen eine polarisierte Verteilung von Membranproteinen erreichen und aufrechterhalten. Ein Prinzip, das dieser gezielten und spezifischen Verteilung von Transmembranproteinen unterliegt, ist die Existenz von Transportsignalen. Diese Motive interagieren entweder direkt oder über Adapterproteine mit zytoplasmatisch lokalisierten Transportproteinen (Martinez-Maza et al., 2001; Muth und Caplan, 2003; Barlowe, 2003), die zur Transportmaschinerie gezählt werden. Die Vorbereitungen für einen korrekten Transport fangen bereits mit der Inserierung des Proteins in das ER an. Während seines Transportes durch die Zelle ist ein Transmembranprotein auf mehrere Signalsequenzen angewiesen, um am Ende am richtigen Oberflächenabschnitt bzw. in der richtigen Organelle anzukommen. Für Polycystin-2 sind bereits 2 solcher Signalsequenzen publiziert. So soll ein Signal-Motiv (RVxP) im N-Terminus

für die Lokalisation des Membranproteins in der Zilienmembran verantwortlich sein (Geng et al., 2006). Eine 34 Aminosäuren umfassende C-terminale Sequenz scheint für die ER-Retention von (exogenem bzw. endogenem) PC2 in Nieren-Zelllinien wie COS-7 (grüne Meerkatze), LLC-PK₁ (Schwein) oder HEK 293 (Mensch) zuständig zu sein (Cai et al., 1999; vgl. auch 1.5). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein weiteres Transportmotiv identifiziert und charakterisiert werden.

A. Polycystin-2 besitzt ein zytoplasmatisch exponiertes Signalmotiv in Schleifendomäne 4, das für den Export zur somatischen Plasmamembran verantwortlich ist

In den Nieren-Zelllinien COS-7 und LLC-PK₁, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, wurde exogenes Polycystin-2, entsprechend den in HeLa-Karzinom (Mensch)- und Nieren-Zellen wie HEK 293, COS M6 (grüne Meerkatze) und LLC-PK₁ gemachten Befunden (Cai et al., 1999; Hidaka et al., 2004; Köttgen et al., 2005) vornehmlich im ER lokalisiert (vgl. 1.5 und 3.2.3). Die C-terminal verkürzte Mutante PC2(1/703) hingegen konnte mit Hilfe von Biotinylierungs-Assays zweifelsfrei an der Plasmamembran von COS-7- und LLC-PK₁-Zellen detektiert werden (vgl. 3.2.3 und 1.5), was nach Cai et al. (1999) mit dem Fehlen des C-terminalen ER-Retentionssignals erklärt werden kann. Auch konnten beide Proteine in der Zilienmembran von transient bzw. stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen detektiert werden (vgl. Hidaka et al., 2004; 3.2.3.B/3.2.4.B und 1.5).

Aufgrund des fehlenden Retentionssignals wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass sämtliche der für die Topologie-Studien konzipierten Schleifenproteine zur Plasmamembran gelangen. Es zeigte sich jedoch, dass lediglich Proteine mit Abbrüchen in den Schleifenregionen 4 und 5 im Stande waren, die Zelloberfläche zu erreichen. Proteine, die in den Schleifenregionen 1-3 abgeschnitten waren, wurden hingegen im ER zurückgehalten (vgl. 3.1.1.A). Da die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der Proteine weder auf unterschiedliche Expressionsraten (vgl. 3.1.1.A) oder Fehlfaltungen infolge der C-terminalen Deletionen bzw. der HA-Epitope bedingt waren (vgl. 3.1.1 und 4.1.1.A), konnte davon ausgegangen werden, dass zwischen Aminosäure 547 (letzte AS von PC2 Schleife 3-HA) und 582 (letzte AS von PC2 Schleife 4-HA) ein sog. Export-Motiv sitzt, das nach Entfernen des C-Terminus bei PC2(1/703) dessen Transport zur Plasmamembran steuert. Weitere HA-markierte Deletionskonstrukte engten den Kandidatenbereich auf Aminosäure 572-577 ein, wobei Topologie-Studien diesen Bereich als zytoplasmatisch exponiert auswiesen (vgl. 3.2.2).

Alanin-Mutationen der Aminosäuren 572-574 bzw. 575-577 in der plasmamembranständigen Deletionsmutante von PC2(1/703) verhinderten deren Translokation zur Plasmamembran, ein Befund, der über Biotinylierungs-Assays und Endo H-Studien erhoben wurde (3.2.3). Die Translokationsdefizienz der Tripel-Alanin-Mutanten wiederum zeigt, dass die im Verlauf der Topologie-Studien als zytoplasmatisch identifizierte, 6 Aminosäuren umfassende Region in Schleifendomäne 4 für sich genommen ausreicht, um den Transport von PC2(1/703) zur Plasmamembran zu steuern. Somit kann die nach den Deletionsmutanten-Studien nicht vollkommen ausschließbare Beteiligung von Aminosäuren der vierten Transmembrandomäne am Export von PC2(1/703) zur Plasmamembran klar verneint werden. Folglich kann man daher das Exportmotiv in die Klasse der zytoplasmatisch exponierten Exportmotive einordnen, zu der beispielsweise auch die sog. di-azidischen oder di-aromatischen Motive von Kir2.1 bzw. Emp24p gehören (Ma et al., 2001; Belden und Barlowe, 2001).

Immunzytochemische Experimente zeigten allerdings, dass die Alanin-Mutagenese des genannten Aminosäurebereiches keinesfalls die Lokalisation von PC2(1/703) in der ziliären Membran verhinderte (vgl. 3.2.3.B). Die Tatsache, dass der Ziliennachweis der Proteine nicht im Biotinylierungs-Assay bzw. Endo H-Assay, sondern nur immunzytochemisch möglich war, kann durch die geringe Größe eines Ziliums im Vergleich zum restlichen Zellkörper erklärt werden. Die Lokalisation der Tripel-Alaninmutanten im Zilium zeigt, dass die Translokationsdefizienz dieser Mutanten zur Plasmamembran nicht von einer veränderten Topologie herrühren kann, da normalerweise falsch gefaltete Proteine nicht das ER verlassen (Ellgard und Helenius, 2001; Muth und Caplan, 2003). Dies wird auch dadurch unterstützt, dass die translokationsdefizienten Alanin-Mutanten nachweislich glykosyliert waren (vgl. 3.2.4.A) und immunzytochemisch über einen gegen das C-terminale HA-Epitop gerichteten Antikörper im ER lokalisiert wurden (Daten nicht gezeigt). So zeigen viele Beispiele von Transmembranproteinen, dass Glykosylierung von der Konformation abhängig ist und falsch gefaltete Proteine meist im ER degradiert werden (Lodish et al., 1996; Reddy und Corley, 1998). Die Lokalisation der translokationsdefizienten Alanin-Mutanten in der Membran von Zilien zeigt aber auch, dass diese auf direktem Weg und nicht über den Umweg der somatischen Plasmamembran, also über Diffusion, ins Zilium gelangt sind. Dies legt nahe, dass die Deletionsmutante PC2(1/703) auf 2 getrennten Wegen zur ziliären bzw. somatischen Plasmamembran gelangt ist, wobei der Transport zur Zilienmembran über das N-terminal gelegene RVxP-Motiv, der Weg zur somatischen Zellmembran hingegen über das in Schleifendomäne 4 befindliche Motiv gesteuert zu werden scheint.

Da die Brefeldin A-Daten (vgl. 3.2.4.B) mit stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen zeigen, dass sowohl Wildtyp-Polycystin-2 als auch PC2(1/703) den Golgi-Bereich erreichen müssen, um ins Zilium zu gelangen, kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine denselben Weg zum Zilium benutzen. Die Daten dieser Arbeit widersprechen somit dem von Geng et al. (2006) publizierten Modell zur Erklärung der Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von Wildtyp-PC2 und seiner Deletionsmutante (vgl. 3.2). Bei dem besagten Modell wird spekuliert, dass beide Proteine zunächst ins Zilium wandern, wobei Polycystin-2 dann durch ein restriktiv wirkendes Motiv (im C-Terminus) dort zurückgehalten wird und PC2(1/703) letztlich über Diffusion in die somatischen Plasmamembranabschnitte gelangt (Geng et al., 2006). Dieses Modell ist jedoch auch aus dem Grund unwahrscheinlich, weil PC2(1/703) bereits an der Plasmamembran detektierbar ist, bevor Zilien ausgebildet sind (Koulen et al., 2002). Außerdem zeigen Beispiele von Proteinen wie dem Typ 6 Serotonin Rezeptor und gp 135 (Podocalyxin), die ausschließlich auf die ziliäre bzw. somatische Plasmamembran beschränkt sind (Brailov et al., 2000; Meder et al., 2005), dass eine Diffusion von Proteinen zwischen diesen beiden Plasmamembran-Kompartimenten, die sich im übrigen auch in ihren zytochemischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden sollen (Satir and Gilula, 1970, Gilula und Satir, 1972), eher unwahrscheinlich ist.

B. Die Aminosäuren 572 und 576 spielen eine elementare Rolle in dem für die somatische Plasmamembran spezifischen Exportmotiv

Nach Caplan und Muth (2003) gibt es eine Reihe von zytoplasmatischen Signalsequenzen, die für eine polarisierte Verteilung von Membranproteinen in der Plasmamembran von epithelialen Zellen sorgen. Diese Signale sorgen jedoch eher für eine polarisierte Verteilung von Membranproteinen im Hinblick auf basolaterale bzw. apikale Plasmamembran-Kompartimente (Matter et al., 1992; Thomas et al., 1993; Matter und Mellmann, 1994; Hunziker und Fumey, 1994; Matter et al., 1994). Die im Rahmen der Arbeit detektierte Signalsequenz scheint jedoch nicht für eine derartige polarisierte Integration von PC2(1/703) innerhalb der somatischen Plasmamembran verantwortlich zu sein, da das Protein mittels Biotinylierungs-Assay sowohl basolateral als auch apikal nachzuweisen ist (Geng et al., 2006). Demnach stellen das N-terminale RVxP- und das in Schleifendomäne 4 befindliche Exportmotiv eine neue Klasse von zytoplasmatisch exponierten Signalsequenzen dar, die eine polarisierte Verteilung von Membranproteinen in ziliäre bzw. nicht ziliäre Plasmamembranabschnitte regulieren können.

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der in Schleife 4 befindlichen Signalsequenz zu untersuchen, wurde jede einzelne Aminosäure des Motivs in Alanine überführt. Im Biotinylierungs-Assay zeigte sich, dass die Translokationsdefizienz der Tripel-Alanin-Mutante PC2(1/703)HA KLF->AAA (AS 572-574) derjenigen nach Ersatz des Lysin-Restes an Position 572 ähnelt, was aber nicht bedeutet, dass die zwei Aminosäuren an Position 573 und 574 völlig bedeutungslos sind. So könnten sie durchaus eine Art Abstandshalter-Funktion übernehmen. Die Tatsache, dass die Umwandlung des Lysin-Restes an Position 572 in Alanin ausreicht, um den Plasmamembrantransport der Deletionsmutante von Polycystin-2 vollständig zu unterbinden, macht deutlich, dass diese Aminosäure eine elementare Rolle in dem Exportmotiv spielt. Dies steht in Einklang zu den Daten für den Transport der K⁺-Kanäle IK1 und SK3, deren Plasmamembranlokalisation von einem Lysin-Rest in der zytoplasmatisch exponierten Schleifendomäne 4 abhängt, also derjenigen Region, welche die Transmembrandomänen 4 und 5 verbindet (Jones et al., 2005). Bei diesen Kanalproteinen handelt es sich um Ca²⁺ aktivierte Kalium-Kanäle, die zur sog. *KCNN*-Genfamilie gezählt werden und von ihrer Membrantopologie mit Polycystin-2 übereinstimmen (also 6 Transmembrandomänen mit zytoplasmatisch exponiertem N- und C-Terminus; vgl. auch Lodish et al., 1996). Wird bei IK1 ein Lysin-Rest an Position 197 (kurz vor Transmembrandomäne 5) und bei SK3 ein Lysin-Rest an Position 453 (entspricht dem Lysin-Rest 197 bei IK1) in ein Alanin umgewandelt, sind beide Kanal-Proteine nicht mehr an der Plasmamembran nachzuweisen. Im Fall des IK1-Kanals wurde sogar gezeigt, dass die Alanin-Mutation spezifisch den Export des Proteins aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran verhindert. Ein ähnliches Phänomen konnte auch bei Kir2.1 Kalium-Kanälen beobachtet werden. So führt ein Ersatz von zwei dicht aufeinanderfolgenden Arginin-Resten durch Alanin im zytoplasmatisch exponierten N-Terminus zur Akkumulierung des Kanals im Golgi-Kompartiment (Stockklausner und Klöcker, 2003).

Die Tatsache, dass die Alanin-Mutationen des Aminosäurebereiches 572-577 in keinsten Weise die Zilienlokalisation von PC2(1/703) beeinflussen, spricht im Hinblick auf die BFA und Sar1a-Daten (vgl. 3.2.4.A und B) ebenfalls dafür, dass das Exportmotiv und insbesondere der Lysin-Rest ebenfalls erst nach dem Eintritt der Mutante in den Golgi-Apparat Bedeutung erlangt. Bisher gibt es aber weder bei IK1- bzw. SK3- noch bei Kir2.1-Kanälen einen Hinweis darauf, welche funktionelle Bedeutung positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin bei auf Vesikelabschnürung basierenden Transportprozessen zukommt. Aufgrund ihrer Ladung würden eventuell elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen

Aminosäuren von Proteinen der Transportmaschinerie oder mit negativ geladenen Kopfgruppen von Phospholipiden wie z.B. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat nahe liegen. So konnte gezeigt werden, dass Bestandteile der Clathrin-Hülle wie AP180 und Epsin mit den negativ geladenen Kopfgruppen von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat interagieren (Ford et al., 2001; Ford et al., 2002), das in sog. Lipid-Raft-Domänen angereichert ist, die beim Transportprozess unter anderem an der die Vesikelbildung beteiligt sein sollen (Ikonen, 2001, Martin, 2001; Cullen et al., 2001; Simonsen et al., 2001). Zur endgültigen Klärung dieser Frage müssten jedoch erst noch weitere Mutagenesestudien bzw. Immunpräzipitationsstudien durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu den IK1- und SK3-Kanälen scheinen bei PC2(1/703) aber noch weitere Aminosäuren eine Bedeutung für den Transport zur Plasmamembran zu haben, da eine Tripel-Alanin-Mutagenese für den Aminosäurebereich 575 bis 577 ebenfalls die Translokation des Proteins zur Plasmamembran verhinderte. Nach den Single-Aminosäure-Austauschen zu urteilen spielt vor allem der Phenylalanin-Rest an Position 576 eine wichtige Rolle. Von Phenylalaninen weiß man bereits, dass diese in Form von sog. di-hydrophoben (z.B. in Kombination mit Tyrosin: FY) oder di-Phenylalanin-Motiven (FF) in zytoplasmatisch exponierten Domänen von Transmembranproteinen wie Erv46p oder ERGIC-53 auftreten und an deren COPII-vermitteltem Export aus dem ER beteiligt sind (Kappeler et al., 1997; Otte und Barlowe, 2002). Im Falle von ERGIC-53 gibt es sogar einen Hinweis darauf, dass die beiden Phenylalanine direkt an der Bindung zu Sec23, einem Bestandteil der COPII-Maschinerie, beteiligt sind (Kappeler et al., 1997). Welche funktionelle Bedeutung der Phenylalanin-Rest an Position 576 bei Polycystin-2 letztlich hat, kann jedoch erst über weitere Mutagenesestudien geklärt werden.

Die Tatsache, dass der Austausch der aromatischen Aminosäure Phenylalanin an Position 576 durch das stark unpolare Alanin nicht - wie bei der entsprechenden Tripel-Alanin-Mutante PC2(1/703)HA KFI->AAA (AS 575-577) zu sehen - zum vollständigen Erliegen der Plasmamembrantranslokation von PC2(1/703) führt, impliziert, dass Aminosäure 576 nicht die einzige der drei Aminosäuren in dem Bereich von Aminosäure 575-577 ist, die eine Rolle bei dem Exportprozess spielt. Der Ersatz der Aminosäurereste 575 und 577 durch Alanine zeigte im Biotinylierungs-Experiment jedoch keine nennenswerten Einbußen in der Translokationseffizienz von PC2(1/703). Im Falle von Aminosäure 577 legen die Versuche mit den HA-markierten Deletionsmutanten jedoch nahe, dass ihr Ersatz durch Tyrosin bei

PC2(1/576)HA bereits zu einer erheblichen Reduktion (~20%) der Translokationseffizienz zur Plasmamembran führt (3.2.2). Dies impliziert, dass Aminosäure 577 bereits eine wichtige Rolle beim Exportprozess zukommt, eine Hypothese, die durch den Befund unterstützt wird, dass der Verlust dieser Aminosäure bei der unmarkierten Deletionsmutante PC2(1/576) zum kompletten Erliegen des Transportes zur Plasmamembran führt (Daten nicht gezeigt). Daher ist es vermutlich nicht verwunderlich, dass der Austausch des unpolaren Isoleucin durch das ebenfalls unpolare Alanin ohne große Folgen für den Translokationsprozess von PC2(1/703) zur Plasmamembran bleibt. In diesem Zusammenhang erscheint die Tatsache interessant, dass die Aminosäuresequenz KLFKFI (572-577) zwischen Mensch, Maus, Ratte und Rind zu 100% konserviert ist und beim Huhn anstelle des Isoleucins an Position 577 ein Valin-Rest sitzt. Dies impliziert, dass der Transport von PC2(1/703) zur Plasmamembran unbeeinträchtigt bleibt, so lange eine unpolare Aminosäure an Position 577 sitzt. Somit scheint sich die Transport inhibierende Wirkung von PC2(1/703)HA KFI->AAA (AS 575-577) erst durch die Kombination der Alanin-Mutation an Position 576 mit einem der beiden oder beiden „Nachbar-Alaninen“ zusammen zu entfalten. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass bei den HA-markierten Deletionsmutanten eine stufenweise Deletion von Aminosäure 577-575 zu einer schrittweisen Abnahme der Plasmamembrantranslokation führt, die mit dem Entfernen von Aminosäure 575 vollständig zum Erliegen kommt (vgl. auch 3.2.2). Letztlich können jedoch auch hier erst weitergehende Mutagenesestudien aufzeigen, welche Rolle den Aminosäuren 575 bzw. 577 bei dem Exportprozess zukommt. Die Tatsache, dass alle Punktmutanten glykosyliert waren, durch das HA-Epitop immunzytochemisch im ER nachweisbar waren und aus dem ER exportiert wurden, um ins Zilium zu gelangen, unterstreicht, dass die Translokationsdefizienz von PC2(1/703)HA KLF->ALF (AS 572) bzw. PC2(1/703)HA KFI->KAI (AS 576) nicht auf Fehlfaltungen der Proteine zurückzuführen sein kann (vgl. auch 4.2.3.A).

C. Der Transportweg zum Zilium

Die Brefeldin A und Sar1a-Mutanten-Versuche in transfizierten LLC-PK₁-Zellen ergaben, dass PC2 und PC2(1/703) unter dem Einfluss des Pilzgiftes und der Inhibitoren des COPII-Vesikeltransportes nicht mehr ins Zilium gelangen. Dieser Befund bestätigt noch einmal die generelle Meinung, dass das ER nicht bis ins Zilium reicht (Ringo, 1967; Kozminski et al., 1993). Wäre dies der Fall, so müssten trotz BFA bzw. trotz Anwesenheit der Mutanten PC2- bzw. PC2(1/703)-positive Zilien zu sehen sein, da beide Proteine durch die Rückfusion von

Golgi-Vesikeln mit dem ER bzw. durch die Inhibierung der Abschnürung von COPII-Vesikeln am ER in dem besagten Kompartiment akkumulieren müssten. Weiterhin lassen die Daten den Schluss zu, dass sowohl die plasmamembranständige Deletionsmutante von Polycystin-2 [PC2(1/703)] als auch das ER-ständige Wildtyp-Protein selbst über COPII-Vesikel vermittelten Transport zum Golgi-Apparat gebracht werden müssen, um ins Zilium zu gelangen (vgl. 3.2.4.B und C). Nach den Daten von Wieland et al. (1987) und Martinez-Menarguez et al. (1999) zu urteilen würde somit ein passiver ER-Exportprozess, der auch als Massenfluss („bulk flow“) bezeichnet wird, als Transportmechanismus von PC2 und PC2(1/703) zwischen ER und Golgi-Apparat ausscheiden. Allerdings gibt es aber auch Hinweise dafür, dass „bulk flow“ COPII-abhängig ist (Kuehn et al., 1998; Malkus et al., 2002).

Ein möglicher Kandidatenbereich für die Interaktion von PC2 mit der COPII-Transportmaschinerie könnte in den ersten 72 Aminosäuren des N-Terminus von Polycystin-2 liegen. So wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus den ersten 72 Aminosäuren von PC2 (enthalten das Zilien-Lokalisationsmotiv RVxP) und der gesamten Aminosäuresequenz von PC2L1 in die ziliäre Plasmamembran von LLC-PK₁-Zellen integriert. Bei PC2L1 handelt es sich um ein PC2 homologes Protein (50% Identität und 71% Ähnlichkeit zu PC2), das nachweislich weder an der ziliären noch an der somatischen Plasmamembran zu sehen ist (Geng et al., 2006). Weiterhin konnte eine PC2(1/703) Variante, die in den N-terminalen Aminosäuren 5-72 deletiert war, weder immunzytochemisch im Zilium noch mittels Biotinylierungs-Assay an der somatischen Plasmamembran von LLC-PK₁-Zellen detektiert werden. Sie erwies sich zudem als komplett sensitiv gegenüber Endoglykosidase H und kolokalisierte im Gegensatz zu PC2(1/703) nicht mit dem Cis-Golgi-Markerprotein GM130 (Geng et al., 2006).

Nach der Fusion der COPII-Vesikel mit Cis-Golgi-Membranen muss dann den Endoglykosidase H-Daten (vgl. 3.2.4.A) nach zu urteilen in diesem Golgi-Bereich der Transportweg für PC2 und PC2(1/703) zum Zilium abzweigen. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass das Zilium, da es sich aus der Zentriole heraus entwickelt, in enge Nachbarschaft zum Golgi-Apparat gelangt (Poole et al., 1997; Praetorius und Spring, 2004). Den Daten von Geng et al. (2006) nach zu urteilen ist das N-terminal gelegene RVxP-Motiv für den Transport von Polycystin-2 zum Zilium verantwortlich. Bisher ist jedoch kaum verstanden, wie Membranproteine wie Polycystin-2 ins Zilium gelangen können (Leroux,

2007). Zwei kürzlich erschienene Publikationen weisen dem Rab8a-Protein, einer sog. kleinen GTPase, eine elementare Funktion in der Zilienbiogenese zu, da das Protein an der „Anlieferung“ von Membranmaterial, einer Voraussetzung für das Zilienwachstum, beteiligt sein soll (Yoshimura et al., 2007; Nachury et al., 2007). So konnte durch den Einsatz von siRNA gegen das Protein bzw. durch die Verwendung einer dominant negativen Rab8a-Mutante, die durch gebundenes GDP „blockiert wird“ [Rab8(T22N)], die Zilienausbildung in hTERT-RPE1-Zellen (humane, immortalisierte Pigmentepithel-Zellen der Retina) inhibiert werden (Yoshimura et al., 2007; Nachury et al., 2007). Weiterhin konnte das Protein an der Zilienbasis (Basalkörper) und im Zilium selbst nachgewiesen werden, wobei Rab8a in konfluenten Zellen, in denen sich Zilien vermehrt ausbilden, auch perinukleär mit dem Cis-Golgi-Markerprotein GM130 kolokalisiert (Hattula et al., 2006; Yoshimura et al., 2007; Nachury et al., 2007). Im Hinblick auf die Daten dieser Arbeit, die für einen Transport von Wildtyp-PC2 und der Deletionsmutante aus dem Cis-Golgi-Bereich zum Zilium argumentieren, stellt Rab8a somit einen vielversprechenden Kandidaten für die Transportmaschinerie zum Zilium dar. Erste Vorversuche mit stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen, die regulierbar ein Fusionsprotein zwischen EGFP und der Deletionsmutante PC2(1/703)HA synthetisieren (vgl. auch 3.2.5 und 2.1.9.A), ergaben, dass das grün fluoreszierende Fusionsprotein nach der Mikroinjektion eines für ECFP-Rab8(T22N) kodierenden Plasmides nur noch in 3 von 32 Zellen im Zilium zu finden ist (die Injektion von einem für ECFP kodierenden Plasmid zeigte hingegen keinen Effekt; pers. Mitteilung Dr. Karin Babinger). Weiterhin wiesen transient kotransfizierte LLC-PK₁-Zellen eine Kolokalisation von EGFP-Rab8a und der HA-markierten Deletionsmutante in Form von perinukleären Vesikeln auf (in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Babinger). Den Daten von Nachury et al. (2007) nach zu urteilen docken die Rab8a-Vesikel an der Zilien-Basis an und fusionieren dort mit der ziliären Membran, wobei für den Eintritt von Rab8a ins Zilium Rabin8 (GEF für Rab8) notwendig sein könnte. Dieses Fusionsmodell an der Zilien-Basis berücksichtigt die generell akzeptierte Meinung, dass es keinerlei Vesikel oder sonstige Bestandteile der Vesikelfusionsmaschinerie wie zum Beispiel SNARE-Proteine im Zilium gibt (Kozminsky et al., 1993).

D. Das Cis-Golgi-Kompartiment bildet den Ausgangspunkt für den Transport von PC2 zur ziliären und somatischen Plasmamembran sowie für den Rücktransport zum ER

Die Endo H- und Brefeldin A-Daten aus transfizierten LLC-PK₁-Zellen zeigen, dass Polycystin-2 zunächst in den Cis-Golgi-Bereich transportiert werden muss, bevor es ins Zilium gelangen kann. Dieser Aspekt legt nahe, dass der ursprünglich für das 34 Aminosäuren umfassende, C-terminale Motiv (AS 787-820) gewählte Ausdruck eines ER-Retentionssignals nicht zutreffend ist. So sprechen die Daten dieser Arbeit in Kombination mit bereits publizierten Transport-Daten von Polycystin-2 dafür, dass das C-terminale Motiv nach dem Eintritt von PC2 in den Golgi-Apparat eher dafür verantwortlich ist, dass das exogene bzw. endogene Protein in Nieren-Zelllinien wie COS M6, COS-7, LLC-PK₁ oder HEK 293 nicht zur somatischen Plasmamembran weitergeleitet werden kann (die Lokalisation von PC2 in der Zilienmembran bleibt davon jedoch völlig unbeeinflusst). Wird der C-Terminus mit der darin befindlichen Signalsequenz abgespalten, können entsprechende (heterolog produzierte) Deletionsmutanten wie PC2(1/703), PC2(1/741) oder PC2(1/786) den Endo H-Daten nach zu urteilen über den Cis-Golgi-Bereich hinaus transportiert werden und in die somatische Plasmamembran der genannten Zelllinien gelangen (Cai et al., 1999; Koulen et al., 2002; Hidaka et al., 2004; Köttgen et al., 2005; vgl.1.5). Dieser Export-Prozess wird gemäß den Daten dieser Arbeit über ein 6 Aminosäuren umfassendes Exportmotiv in der zytoplasmatisch exponierten Schleifendomäne 4 gesteuert (vgl. 3.2).

Nach Caplan und Muth (2003) kommt es relativ häufig vor, dass nach Entfernen von sog. primären Transportsignalen „verborgene“ Sortiersignale exponiert bzw. aktiviert werden. Es wäre demnach also durchaus denkbar, dass in Nieren-Zelllinien wie COS M6, COS-7, LLC-PK₁ bzw. HEK 293 die Weiterleitung von exogenem bzw. endogenem Polycystin-2 zur somatischen Zellmembran verhindert wird, weil der Zugang der Transportmaschinerie zu dem Exportmotiv durch die Wechselwirkung eines Proteins mit PC2 in dessen (zytoplasmatischem) C-terminalen Aminosäurebereich 787-968, also durch sterische Blockade, verhindert bzw. maskiert wird. Somit würde der intrazelluläre Transport, (abgesehen von dem N-terminalen RVxP-Motiv) primär durch das C-terminale Motiv gesteuert werden. Bei der Insekten-Zelllinie Sf9 und den Nieren-Zelllinien MDCK oder mIMCD3, wo heterologes bzw. endogenes Polycystin-2 an der Plasmamembran nachzuweisen sein soll (González-Perrett et al., 2000; Luo et al., 2003; Streets et al., 2005; vgl. 1.5), könnte diese Maskierung bedingt durch Unterschiede im zellulären Proteinpool

wegfallen und somit das Exportmotiv für den Transportapparat zur Plasmamembran zugänglich machen. Auf diese Weise könnte ein Teil von Polycystin-2 neben der ziliären auch zur somatischen Zellmembran gelangen. Nachdem nun ein gewisser Anteil des zum Cis-Golgi-Apparates transportierten Polycystin-2 zum Zilium bzw. zur somatischen Plasmamembran gelangt ist, bestünde die Möglichkeit, dass der restliche Anteil von Polycystin-2 degradiert wird. Pulsmarkierungen von PC2 fl-HA in stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen, die über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt wurden, sprechen jedoch für eine recht hohe Stabilität des Proteins (Cedzich, 2000). Daher erscheint es wahrscheinlicher, dass der restliche Anteil des „Golgi-Pools“ von Polycystin-2 mit Hilfe des C-terminalen Sequenzmotivs zum ER zurücktransportiert wird, so dass man in diesem Fall wohl besser von einem ER-Rücktransportsignal spricht. Dies wird auch durch den Befund unterstützt, dass PC2 unter anderem mit dem sog. PACS-2-Protein in dem als „saurem Cluster“ bezeichneten Abschnitt des C-terminalen Sequenzmotivs interagiert (Köttgen et al., 2005; vgl. 1.5). PACS-2 wiederum ist ein Protein, welches mit COPI, einem Bestandteil der Rücktransportmaschinerie vom Golgi-Apparat zum ER, wechselwirken kann (Murshid und Presley, 2004; Simmen et al., 2005; Köttgen et al., 2005). So akkumuliert exogenes Polycystin-2 unter dem Einfluss einer dominant-negativen Mutante von PACS-2 im Golgi-Apparat der Nieren-Zelllinie COS M6, ein Befund, der über Kolokalisationsstudien erhoben wurde. Nach den Daten von Köttgen et al. (2005) zu urteilen führt die Phosphorylierung eines Serinrestes an Position 812 zu einer verstärkten Wechselwirkung von PC2 mit PACS-2, was wiederum die vornehmliche ER-Lokalisation von heterologem PC2 in COS M6-Zellen erklärt. Dies steht jedoch im Widerspruch zu Daten aus LLC-PK₁-Zellen, die dafür sprechen, dass die Phosphorylierung des Serinrestes an Position 812 keinerlei Einfluss auf den Transport von exogenem Polycystin-2 hat (Cai et al., 2004). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Gruppen könnten unterschiedlich sensitive Versuchstechniken oder unterschiedliche Zelltypen sein.

Nachdem nun das Cis-Golgi-Kompartiment entsprechend den Daten dieser Arbeit eine zentrale Rolle für den Transport von Polycystin-2 und seiner Deletionsmutante spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, diesen Aspekt auch auf immunzytochemischer Ebene mit Kolokalisationsexperimenten zu untermauern. So konnte keinerlei Kolokalisation von PC2 und PC2(1/703) mit einem Cis-Golgi-Markerprotein wie GM130 in transient transfizierten LLC-PK₁-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). PC2(1/703) kolokalisierte auch in stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen nicht mit Giantin (an der Bildung

von Quervernetzungen zwischen den Golgi-Zisternen beteiligt), einem weiteren Golgi-Markerprotein (Daten nicht gezeigt), obwohl die Endo H-Studien und PNGase F-Daten (vgl. 3.2.4.A; Cai et al., 1999; Cedzich, 2000) nahelegen, dass PC2(1/703) dieses Organell passiert. Dies lässt vermuten, dass die Transportkinetiken durch dieses Organell zu schnell sind, um mit immunzytochemisch geführten Kollokalisationsstudien nachgewiesen zu werden. Vermutlich spielt aber neben der Transportkinetik auch noch die Menge an Protein eine Rolle, die aus dem ER exportiert wird. So zeigten Pulsmarkierungen in stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen, die über einen Zeitrahmen von 24 Stunden geführt wurden, dass zu jedem Zeitpunkt mindestens 50% oder mehr des radioaktiv markierten PC2(1/703)-Proteins immer noch Endo H sensitiv waren (vgl. auch Cedzich, 2000). Die Tatsache, dass Geng et al. (2006) in stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen zumindest eine partielle Kollokalisierung von PC2(1/703) mit GM130 zeigt, könnte eventuell daran liegen, dass die Gruppe andere Zellkultivierungsbedingungen verwendet, die sich auf den Stoffwechsel der Zellen und damit natürlich auch auf den Transport von Proteinen auswirken.

E. Löst eine gestörte Hierarchie der Transportsignale den ADPKD-Phänotyp aus?

Abschließend kann aus den Daten dieser Arbeit und den bereits für den Transport von Polycystin-2 veröffentlichten Daten folgendes Modell für den intrazellulären Transport von Polycystin-2 aufgestellt werden (vgl. auch Abb. 59).

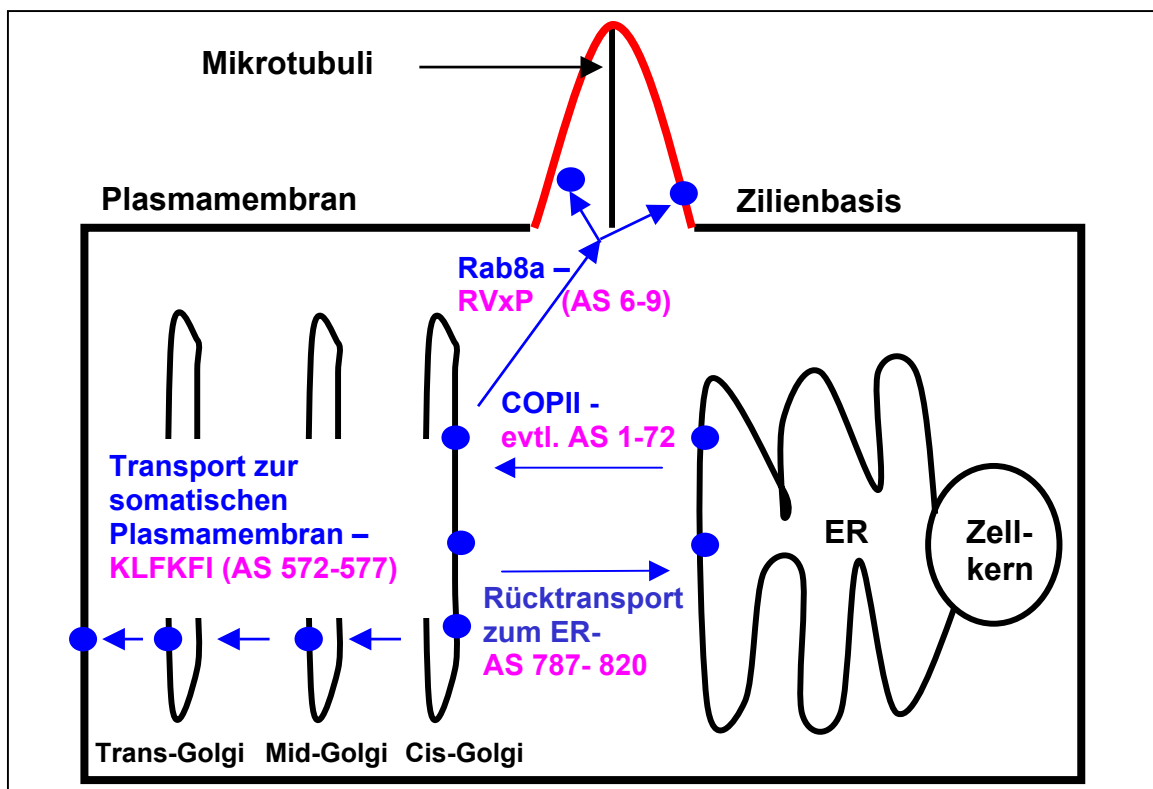


Abb. 59: Modell für den intrazellulären Transport von Polycystin-2. Polycystin-2 wird über COPII-vermittelten Transport vom ER zum Cis-Golgi-Apparat gebracht. Von dort gelangt das Protein aufgrund seines RVxP-Motivs über Rab8a vermittelten Transport zur ziliären Plasmamembran. In manchen Zelllinien wie MDCK oder mIMCD3 kann das Protein über das in Schleifendomäne 4 befindliche KLFKFI-Motiv zusätzlich zur somatischen Plasmamembran transportiert werden. Vom Cis-Golgi-Apparat wird das Protein über ein 34 Aminosäuren umfassendes C-terminales Transportsignal zum ER zurückgebracht. Weitere Erläuterungen sind unter 4.2.3.A-4.2.3.D zu finden.

Die in den verschiedenen Zellkultursystemen beobachteten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von Polycystin-2 (vgl. auch Abb. 59) spiegeln sich auch in den unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen des Proteins bei verschiedenen Geweben und in verschiedenen Stadien der Nierenentwicklung wider (vgl. 1.5; Obermüller et al., 1999; Ong et al., 1999), wobei PC2 in adulten Nieren, ähnlich den Befunden aus Nieren-Zellen wie COS-7, LLC-PK₁ oder HEK 293 im Zilium und intrazellulär in einem basalen Kompartiment nachzuweisen ist (Gallagher et al., 2006). Dies zeigt, dass Polycystin-2 zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten bzw. in bestimmten Organen eine fest definierte subzelluläre Lokalisation haben muss, um seinen Beitrag als nicht selektiver Kationen-Kanal zum Stoffwechsel der Zelle leisten zu können. Die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen von PC2 scheinen dabei durch eine wohldefinierte Hierarchie bzw. durch ein wohldefiniertes Gleichgewicht der in Abbildung 59 dokumentierten Transportsignale gesteuert zu werden (vgl. auch 4.2.3.C und D). Für viele Kanalproteine wie zum Beispiel den Chlorid-Ionen-Kanal CFTR ist bekannt, dass eine Entfernung bzw. Zerstörung einer oder mehrerer dieser Transport regulierenden Sequenzen diese Hierarchie bzw. dieses Gleichgewicht stört und letztlich in einer Fehllokalisierung und damit verbunden auch in einer Fehlfunktion des Proteins resultiert (Kopito, 1999; Caplan und Muth, 2003). Im Falle von Polycystin-2 zeigte sich, dass eine nach Aminosäure 703 deletierte Mutationsform des Proteins bei transgenen Ratten zu einem ADPKD-Phänotyp führt, der mit dem menschlichen Phänotyp vergleichbar ist. Die Deletionsmutante war im Gegensatz zu dem Wildtyp-Protein nicht mehr in einem basalen Kompartiment, sondern am Bürstensaum zu finden (Gallagher et al., 2006), was nach den Ausführungen von Caplan und Muth (2003) zu urteilen auf die Verschiebung der Transport-Hierarchie-Verhältnisse zugunsten des in Schleifendomäne 4 befindlichen Exportmotivs zurückzuführen sein kann (vgl. auch 4.2.3.D). Nach Aminosäure 703 bzw. 741 deletierte Mutanten von Polycystin-2 funktionieren immer noch als Kanal, sie sind jedoch nicht mehr durch Calcium aktivierbar, da vermutlich eine im C-Terminus befindliche sog. EF-Hand (AS 754-782 im C-Terminus) fehlt (Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002). Daher kann angenommen werden, dass die transgenen Ratten neben der fehlenden Regulierung durch Calcium unter anderem auch deshalb einen ADPKD-Phänotyp entwickeln, weil die nach Aminosäure 703 abgeschnittene Polycystin-2-Mutante fehllokalisiert ist.

F. Ausblick

Um zu verifizieren, ob die weiter oben erläuterten Hypothesen und das unter Abbildung 59 gezeigte Modell für den intrazellulären Transport von Polycystin-2 zutreffen, müssten die im Modell gezeigten Transportsignale über weitere Mutagenesestudien noch eingehender charakterisiert werden, wobei z.B. im Falle des ER-Rücktransportsignals vermutlich zunächst mit Hilfe von Deletionsmutanten eine Einengung auf den notwendigen Minimalbereich vorgenommen werden sollte. Über Immunpräzipitationsstudien in entsprechenden Nierenepithel-Zellen oder Nierengewebe könnte dann nach Bindungspartnern für das Exportmotiv in Schleife 4 gesucht werden und geklärt werden, welche bzw. ob die postulierten Interaktionspartner für die restlichen Motive zutreffen. Durch Einsatz von siRNA-Technik bzw. durch Verwendung von dominant negativen Mutanten könnte dann der Transport von Polycystin-2 auch auf funktioneller Ebene weiter untersucht werden. Um die Frage zu klären, ob Polycystin-2 tatsächlich das Cis-Golgi-Kompartiment passiert, wäre möglicherweise die sog. FIAsh-Methode (Adams et al., 2002; Gaietta et al., 2002) eine gute Alternative. Bei dieser Methode, die auch als „Tetracystein-biarsenical-Tag-Methode“ bezeichnet wird, wird eine Peptidsequenz bestehend aus zwei durch ein Prolin-Glycin-Motiv getrennten Cystein-Paaren an das Zielprotein gehängt. Durch ein membranpermeables Fluorophor, das an die Peptidsequenz bindet, kann dann das Zielprotein bei Anregung im entsprechenden Wellenlängenbereich sichtbar gemacht werden. Der große Vorteil dieser Technik gegenüber der Verwendung von EGFP als Fusionsprotein liegt an der geringen Größe des angehängten Epitops (Hoffmann und Lohse, 2006).

5. Zusammenfassung

PKD2 ist eines der Gene, die im Falle einer Mutation zur Entstehung der autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) führen. *PKD2* kodiert für ein 968 Aminosäuren umfassendes Membranprotein (PC2), das 6 Transmembrandomänen besitzen soll, wobei der N- und C-Terminus ins Zytoplasma ragen. PC2 fungiert als nicht selektiver Kationen-Kanal in der Membran des ER bzw. des Ziliums. Die Lokalisation im Zilium soll über ein N-terminales Motiv gesteuert werden, die Lokalisation im ER hingegen über ein C-terminales Transportsignal, da C-terminale Deletionsmutanten von PC2 zur Plasmamembran gelangen. In manchen Zelllinien wird jedoch z.T. auch eine Plasmamembranlokalisation des Volllängen-Proteins berichtet. Bisher sind noch keine Hot-Spots für Mutationen bekannt, so dass noch nicht verstanden ist, wie Mutationen in *PKD2* zu ADPKD führen. Daher sollte die Proteinstruktur über Topologie-Studien charakterisiert werden, wobei ebenfalls NMR-Analysen der C-terminalen Domäne, die für die meisten Protein-Interaktionen von PC2 von Nöten ist, durchgeführt wurden. Bindungsstudien mit Interaktionspartnern wie PC1, PIGEA-14 oder Calcium sollten helfen, die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkungen besser beurteilen zu können. Schließlich sollte ein Exportmotiv charakterisiert werden, das zum besseren Verständnis der subzellulären Lokalisation von PC2 beitragen sollte.

Um die Orientierung der postulierten Schleifendomänen sowie des N- und C-Terminus zu überprüfen, wurde zunächst eine immunzytochemische Studie mit Polycystin-2-Konstrukten durchgeführt, die in den jeweiligen Schleifendomänen abgeschnitten waren und ein C-terminales Antikörper-Epitop trugen. Die so erhaltenen Daten stehen in Einklang zu dem entworfenen Modell und konnten durch Protease-protection-Assays mit Mikrosomenpräparationen bestätigt werden.

Die ER-Retention von PC2-Versionen mit Abbrüchen in Schleifendomäne 1-3 und die Translokation von PC2-Versionen mit Abbrüchen in Schleifendomäne 4 und 5 zur Plasmamembran deuteten auf die Existenz eines Exportmotivs hin. Durch weitere, C-terminal verkürzte Deletionsmutanten sowie Alanin-scanning-Mutagenesestudien in Verbindung mit Biotinylierungs-Assays an einer plasmamembranständigen, C-terminalen Deletionsmutante von PC2 konnte das Motiv auf 6 Aminosäuren (AS 572-577) in Schleifendomäne 4 eingegrenzt werden. Einem Lysin-Rest (AS 572) und einem Phenylalanin-Rest (AS 576) kommt dabei eine besondere Rolle beim Export zu. Somit wurde ein neues, zytoplasmatisch

gelegenes Exportmotiv identifiziert, das die spezifische Lokalisation von PC2 in der somatischen Plasmamembran einiger Zelllinien zu ermöglichen scheint, da die Zilienlokalisierung der C-terminalen Deletionsmutante durch die Alanin-Mutationen unbeeinflusst bleibt. Der letzte Aspekt legt nahe, dass PC2 auf zwei unabhängigen Wegen zur ziliären bzw. somatischen Plasmamembran gelangt. Diese Transportwege scheinen sich im Golgi-Apparat zu trennen, da PC2 und seine C-terminale Deletionsmutante in Gegenwart von entsprechenden „Transport-Inhibitoren“ nicht mehr ins Zilium gelangen. Endo H-Assays deuten an, dass es sich dabei um das Cis-Golgi-Kompartiment handelt.

Für die strukturelle Charakterisierung des C-Terminus von PC2 über NMR wurde dieser zweigeteilt (AS 680-796 und AS 797-968) und die entsprechenden Peptide rekombinant hergestellt. Diffusionsmessungen bzw. Gelfiltrationen zeigten, dass das größere (AS 797-968) der beiden Peptide homomere Interaktionen eingeht, so dass die Notwendigkeit der Coiled-coil-Domäne (AS 763-796) für die Selbst-Interaktion ausgeschlossen werden kann. Das Peptid lag HSQC-Spektren nach zu urteilen größtenteils unstrukturiert vor. Die HSQC-Spektren des kleineren (AS 680-796) Peptides offenbarten, dass dieses erst spezifisch durch Zugabe von Calcium strukturiert wird, wobei das Peptid dann vornehmlich in Form von α -Helices organisiert ist. Calcium-Titrations in Verbindung mit 1D-Protonenspektren deuten an, dass ein paarweise angeordnetes Helix-Loop-Helix-Motiv des Peptides ein Ca^{2+} -spezifisches, sequentiell kooperatives EF-Hand-Paar bildet, das sich durch K_d -Werte um $161 \pm 36 \mu\text{M}$ (N-term. Motiv) bzw. $51 \pm 4 \mu\text{M}$ (C-term. Motiv) auszeichnet. Letzterer Wert liegt im Größenbereich des per Fluoreszenzspektroskopie für die C-terminale EF-Hand bestimmten K_d -Wertes von 70-90 μM . Alle ermittelten K_d -Werte liegen im Rahmen der bisher für Ca^{2+} -bindende Proteine ermittelten Dissoziationskonstanten.

Daneben sollten auch die Bindungsparameter für die Interaktionen von PC2 mit PIGEA-14 und PC1 über Quarzmikroaagetchnik bestimmt werden. Hierzu wurden C-terminal His-fusionierte Interaktionsdomänen der Bindepartner rekombinant hergestellt, auf einer Ni^{2+} -Lipid-Membran immobilisiert und im Anschluss mit dem rekombinant hergestellten C-Terminus von PC2 inkubiert. Für die Wechselwirkung von PC2 mit PC1 ergab sich ein K_d -Wert von $46 \pm 13 \text{ nM}$, für die Interaktion mit PIGEA-14 ein K_d -Wert von $146 \pm 35 \text{ nM}$, so dass beide K_d -Werte als stark zu bezeichnen sind.

Die K_d -Werte der Interaktionen des C-Terminus von PC2 mit PC1, PIGEA-14 und Calcium sprechen somit für deren physiologische Relevanz, wobei Calcium maßgeblich an der helikalen Strukturierung der C-terminalen Domäne beteiligt zu sein scheint. PC2 besitzt nachweislich 6 Transmembrandomänen, wobei die N- und C-Termini zytoplasmatisch orientiert sind. Über die Maskierung bzw. freie Zugänglichkeit des Golgi-Exportmotivs in Schleife 4 könnte schließlich die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von PC2 erklärt werden. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl ein Beitrag zur strukturellen als auch zur funktionellen Charakterisierung von PC2 geleistet. Dies wiederum könnte helfen zu verstehen, inwiefern Mutationen im *PKD2*-Gen zum Ausbruch von ADPKD führen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Weitere Erklärungen zu Proteinen und deren Funktionen sind unter 1, 3 und 4 zu finden.

A	Ampere
A_{280}	Extinktionskoeffizient bei 280 nm
$^{0,1\%}A_{280}$	spezifischer Extinktionskoeffizient
A_{590}	Absorption bei 590 nm
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
Amp	Ampicillin
AP-1	„activating protein 1“ Transkriptionsfaktor
AP 180	„adaptor protein 180“ (Bestandteil von „clathrin-coated vesicles“)
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	„ADP ribosylation factor“
ARPKD	Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung
AS	Aminosäure
B	Beads
Ba^{2+}	Barium
BA	Bisacrylamid
BAP	„bacterial alkaline phosphatase“
bp	Basenpaare
BFA	Penicillium brefeldianum
BSA	Rinderserum-Albumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration (z.B. von zugegebenem Ligand)
c_{L0}	definierte Ligandkonzentration
$^{13}C_6$	$^{13}C_6$ -Atom
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CaVP	„calcium vector protein“
CD8	Plasmamembran-Markermolekül für zytotoxische T-Zellen („ <u>cluster of differentiation</u> “)

CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“
CK2	Casein Kinase 2
Cl _a	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxyterminus
Co-IP	Koimmunpräzipitation
COOH-Terminus	Carboxyterminus
COPI- und II	„coat protein complex type I and II“
CTP	Cytosintriphosphat
d	„day“ (Tag)
Da	„Dalton“
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D ₂ O	deutერიertes Wasser
Dr.	Doktor
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreit
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient
E ₀	Gesamt-Proteinkonzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECFP/EGFP	„enhanced cyan/green fluorescent protein“
Emp24p	integrales Membranprotein von COPII-Vesikeln, das eine Funktion im Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat innehat
Endo H/EH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC-53	„ER-Golgi intermediate compartment protein 53“
Erv46p	ER-Vesikel (Erv)-Membranprotein von 46 kDa, das am Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat beteiligt ist
evtl.	eventuell
Δf	Änderung der Resonanzfrequenz
Δf_e	maximale Frequenzänderung nach Zugabe einer definierten Ligandkonzentration $c_{L,0}$
F	Fluoreszenzemission, die gemessen wird
F ₀	Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt 0
F _{max}	maximale Fluoreszenzemissionsänderung

galT	„galactosyltransferase“
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPS	G-Protein gekoppelter Rezeptor Proteolyse-Stelle
G-Proteine	gehören zur GTPase-Superfamilie: Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen werden durch unterschiedliche G-Proteine mit einer Vielzahl von Effektorproteinen verbunden
GSK 3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
² H	Deuterium
HA	Hämagglutinin
Hax-1	„HS1-associated protein X-1“
HCl	Salzsäure
His	Histidin
His-Epitop	Histidin-Epitop
H ₂ O	Wasser
hPC1	humanes Polycystin-1
hPC2	humanes Polycystin-2
hSt	humaner Syzytiotrophoblast
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
Hz	Hertz
ICP-OES	Atomemissionsspektralanalyse mit induktiv gekoppeltem Plasma
Id2	„inhibitor of DNA binding 2“
IDA	„iminoacetic acid“
Ig	Immunglobulin
IK1-Kanal	„intermediate conductance“-Kalium-Kanalprotein1 (durch Calcium aktiviert; Subfamilie N: <i>KCNN</i>)
IP	Immunpräzipitation
IP ₃ R	„inositol 1, 4, 5 trisphosphate (IP3)-receptor“
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITC	Isothermale Titrations-Kalorimetrie
JAK	Janus-Kinase: phosphoryliert Tyrosinreste von z.B. STAT-Proteinen
<i>K_d</i>	Dissoziationskonstante
<i>k_{on}</i>	Assoziationsratenkonstante

k_{off}	Dissoziationsratenkonstante
k_s	Ratenkonstante
KAc	Kaliumazetat
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KCNN-Familie	Familie von Calcium aktivierten Kalium-Kanälen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KIF3A/ KIF3B	„kinesin family member 3A/3B“
Kir 2.1	„inward rectifying K^+ -channel“ (einwärtsgleichrichtender Kalium-Kanal; Untergruppe 2.1)
l	Liter
L_0	Gesamt-Ligandkonzentration
LB-Medium	Luria Bertoni-Medium
LDL-A	„low-density lipoprotein-A“
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
mA	Milliampere
Mg^{2+}	Magnesium
MgSO_4	Magnesiumsulfat-7-hydrat
MBP	Maltose-Binde-Protein
MCS	vielfache Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
mDia1	„mammalian diaphanous 1“
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
Mn^{2+}	Mangan
mPC1	Maus-Polycystin-1
mPC2	Maus-Polycystin-2
MWCO	„molecular weight cut off“
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar

^{15}N	^{15}N -Atom
Na^+	Natrium
NaAc	Natriumazetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NH_2	Aminoterminus
Ni^{2+}	Nickel
NiSO_4	Nickelsulfat
nm	Nanometer
NMR	„nuclear magnetic resonance“
NTA	„nitrioloacetic acid“
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
P	Pellet
PACS1/2	„phosphoforin acidic cluster protein 1/2“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	Polymerase, rekombinant aufgereinigt aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PIGEA-14	„polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmatic reticulum-associated protein with a molecular mass of 14 kDa“
PKD	polyzystische Nierenerkrankung
<i>PKD1</i>	„polycystic kidney disease 1“ (Gen)
<i>PKD2</i>	„polycystic kidney disease 2“ (Gen)
PC1C	Carboxyterminus von Polycystin-1
PK	Proteinase K
PC2C	Carboxyterminus von Polycystin-2
PLAT	Polycystin Lipxygenase α
pmol	pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	<u>P</u> eptid- <u>N</u> ^A -(<u>N</u> -acetyl- β -glucosaminy)asparagin- <u>A</u> midase aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>

Pol.	Polymerase
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QCM	Quarzmikrowaage
R	Widerstand
Rab-Familie	Familie von GTPasen, die unter anderem bei der Vesikelfusion mitwirken
REJ	„receptor for egg jelly“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
s.	siehe
Sar1a	„secretion associated and Ras-related small GTPase“; ungefähr 21 kDA großes GTP-bindendes Protein, das Bestandteil der COPII-Vesikelhülle ist und am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt ist
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sec12	GEF (aus Hefe; Sec: „secretory“),
Sec23	(Sec: „secretory“); GTPase aktivierendes Protein, das im Komplex mit Sec24 ein Bestandteil der COPII-Vesikelhülle ist und am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt ist
Sec24	(Sec: „secretory“); Protein, das im Komplex mit Sec23 ein Bestandteil der COPII-Vesikelhülle ist und am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt ist (tritt direkt in Kontakt mit der zytoplasmatisch exponierten Signalsequenz des zu transportierenden Proteins)
Ser	Serin
SH3-Domäne	Src-homologe Region Nr. 3
SK3-Kanal	„small conductance“- Kalium-Kanalprotein3 (durch Calcium aktiviert; Subfamilie N: <i>KCNN</i>)
SNARE	soluble <i>NSF attachment receptor</i>
SPR	Oberflächen-Plasmonresonanz
STAT	„signal transducers and activators of transcription“: Transkriptionsfaktor
t	„time“ (Zeit)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer

TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	transmembran
TM-1	Tropomyosin-1
TnC	„cardiac troponin (calcium binding) subunit C“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TRP	„transient receptor potential“
TRPC	„transient receptor potential-channel type C“
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
Ü	Überstand
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v:v	Verhältnis Volumen zu Volumen
vgl.	vergleiche
tsO45-VSV-G	Temperatur-sensitive Mutante des „vesicular stomatitis virus glycoprotein“
z.B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7. Literatur- und Personenverzeichnis

7.1 Zitierte Literatur

Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J and Tsien R.Y. (2002). New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications. *J. AM. CHEM. SOC.* **124**, 6063-6076

Ahlers M., Müller W., Reichert A., Ringsdorf H. and Venzmer J. (1990). Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten – Wege zur Simulation von Biomembranprozessen. *Angew. Chem.* **102**, 1310-1327

Aitio H., Laakso T., Pihlajamaa T., Torkkeli M., Kilpelainen I., Drakenberg T., Serimaa R. and Annala A. (2001). Characterization of apo and partially saturated states of calerythrin, an EF-hand protein from *S. erythraea*: a molton globule when deprived of Ca^{2+} . *Protein Sci* **10**, 74-82

Altin J. G. and Pagler E.B. (1995). A One-Step Procedure for Biotinylation and Chemical Cross-linking of Lymphocyte Surface and Intracellular Membrane-Associated Molecules. *Anal. Biochem.* **224**, 382-389

Amersham Biosciences (2001). The Recombinant Protein Handbook-Protein Amplification and Simple Purification. *Amersham Pharmacia Biotech, AB 2001, 18-1142-75. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany (jetzt: GE Healthcare München, Germany)*

Amersham Biosciences (2005). Ni Sepharose 6 Fast Flow (instruction-manual). *Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg (Germany), 11-0008-87 Edition AA (jetzt: GE Healthcare München, Germany)*

Andersson M., Malmendal A., Linse S., Ivarsson I., Forsen S. and Svenson L.A. (1997). Structural basis for the negative allosteric between Ca^{2+} - and Mg^{2+} -binding in the intracellular Ca^{2+} -receptor calbindin D_{9k} . *Protein Sci.* **6**, 1139-1147

Andrieu N., Salvayre R. and Levade T. (1996). Comparative study of the metabolic pools of sphingomyelin and phosphatidylcholine sensitive to tumor necrosis factor. *Eur. J. Biochem.* **236**, 737-745

Aridor M., Fish K.N., Bannykh S., Weissman J., Roberts T.H., Lippincott-Schwartz J. and Balch W.E. (2001). The Sar1 GTPase Coordinates Biosynthetic Cargo Selection with Endoplasmic Reticulum Export Site Assembly. *J. Cell Biol.* **152**, 213-229

Arnould T., Kim E., Tsiokas L., Jochimsen F., Gruning W., Chang J.D. and Walz G. (1998). The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J. Biol. Chem.* **273**, 6013-6018

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (2007). CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. *John Wiley & Sons, New York (USA)*

Barlowe C. (2003). Signals for CopII-dependent export from the ER: what's the ticket out?. *TRENDS in Cell Biology* **13**, 295-300

Barlowe C. (2003)a. Molecular Recognition of cargo by the COPII Complex: A Most Accomodating Coat. *Cell* **114**, 395-399

Bhunja A.K., Piontek K., Boletta A., Liu L., Qian f., Xu P.N., Germino F.J. and Germino G.G. (2002). PKD1 induces p21 (waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signalling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* **19**, 157-168

Belden W.J. and Barlowe C. (2001). Distinct Roles for the Cytoplasmic Tail Sequences of Emp24p and Erv25p in Transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 43040-43048

- Bosk S. (2007).** Quantifizierung der Wechselwirkung von Polycystin-2 mit seinen spezifischen Interaktionspartnern mittels Quarzmikroaagetechnik (Diplomarbeit am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter Prof. Dr. C. Steinem)
- Bradford M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brailov I., Bancila M., Brisorgueil M.-J., Miquel M.-C., Hamon M. and Vergé D. (2000).** Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.* **872**, 271-275
- Bycroft M., Bateman A., Clarke J., Hamill S.J., Sandford R., Thomas R.L. and Chothia C. (1999).** The structure of a PKD domain from polycystin-1: Implications for polycystic kidney disease. *EMBO Journal* **18**, 297-305
- Cai Y., Maeda Y., Cedzich A., Torres V.E., Wu G., Hayashi T., Mochizuki T., Park J.H., Witzgall R. and Somlo S. (1999).** Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J. Biol. Chem.* **274**, 28557-28565
- Cantiello H.F. (2004).** Regulation of calcium signalling by polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, 1012-1029
- Cedzich A. (2000).** Charakterisierung des polyzystischen Nierenproteins PKD2 und seiner L703-Deletionsmutante in permanenten Zelllinien (Inauguraldissertation zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprechts-Karls-Universität zu Heidelberg)
- Charron A.J., Nakamura S., Bacallao R. and Wandinger-Ness A. (2000).** Compromised cytoarchitecture and polarized trafficking in autosomal dominant polycystic kidney disease cells. *J Cell Biol* **149**, 111-124
- Chauvet V., Tian X., Husson H., Grimm D.H., Wang T., Hieseberger T., Igarashi P., Benett A.M., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Somlo S. and Caplan M.J. (2004).** Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C-terminus. *J Clin Invest* **114**, 1433-1443
- Chen X.Z., Zhu T., Smith D.E. and Hediger M.A. (1999).** Stoichiometry and kinetics of the high affinity H⁺-coupled peptide transporter PepT2. *J. Biol. Chem.* **274**, 2773-2779
- Chung C.T., Niemala S.L. and Miller R.H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175
- Clapham D.E., Runnels L.W. and Strübing C. (2001).** THE TRP ION CHANNEL FAMILY. *Nature Reviews, Neuroscience* **2**, 387-396
- Claros M.G. and von Heijne G. (1994).** TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* **10**, 685-686
- Cullen P.J., Cozier G.E., Banting G. and Mellor H. (2001).** Modular phosphoinositide-binding domains – their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol.* **11**, R882-R893
- Daoust M.C., Reynolds D.M., Bichet D.G. and Somlo S. (1995).** Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* **25**, 733-736
- Delmas P., Nomura H., Li X., Lakkis M., Luo Y., Segal Y., Fernandez-Fernandez J.M., Harris P., Frischauf A.M., Brown D.A. and Zhou J. (2002).** Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 11276-11283
- Dewji N.N., Valdez D. and Singer S.J. (2004).** The presenilins turned inside out: Implications for their structures and functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1057-1062
- Dinter A. and Berger E.G. (1998).** Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell. Biol.* **109**, 571-590
- Dong Y., Skoultchi A.I., Pollard J.W. (1993).** Efficient DNA transfection of quiescent mammalian cells using poly-L-ornithine. *Nucleic Acids Res.* **21**, 771-772

- Dorn I.T., Neumaier K.R. and Tampé R. (1998).** Molecular recognition of Histidine-Tagged Molecules by Metal-Chelating Lipids Monitored by Fluorescence Energy Transfer and Correlation Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2753-2763
- Dunbar L.A., Aronson P. and Caplan M.J. (2000).** A Transmembrane Segment Determines the Steady-state Localization of an Ion-transporting Adenosine Triphosphatase. *J. Cell Biol.* **148**, 769-778
- Dransfield D.T., Bradford A.J., Smith J., Martin M., Roy C., Mangeat P.H. and Goldenring J.R. (1997).** Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *The EMBO Journal* **16**, 35-43
- Ellgaard L. and Helenius A. (2001).** ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 431-437
- Engelman D.M. and Streitz T.A. (1981).** The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23**, 411-422
- Fiedler K. and Rothman J. E. (1997).** Sorting determinants in the transmembrane domain of p24 proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 24739-24742
- Field J., Nikawa J.I., Broek D., MacDonald B., Rodgers L., Wilson I.A., Lerner R.A. and Wigler M. (1983).** Purification of a RAS-Responsive Adenylyl Cyclase Complex from *Sacharomyces Cerevisiae* by Use of an Epitope Addition Method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4949-4953
- Ford M.G.J., Pearse B.M.F., Higgins M.K., Vallis Y., Owen D.J., Gibson A., Hopkins C.R., Evans P.R. and McMahon H.T. (2001).** Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* **291**, 1051-1055
- Ford M.G.J., Mills I.G., Peter B.J., Vallis Y., Praefke G.J.K., Evans P.R. and McMahon H.T. (2002).** Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361-366
- Franz A., Maass K. and Seedorf M. (2007).** A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of Ist2 from the yeast ER to the plasma membrane. *FEBS Letters* **581**, 401-405
- Gabow P.A. (1993).** Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **329**, 332-342
- Gagne S.M., Li M.X. and Sykes B.D. (1997).** Mechanism of direct coupling between binding and induced structural change in regulatory calcium binding proteins. *Biochemistry* **36**, 4386-4392
- Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky D.E., Tsien R.Y. and Ellisman M.H. (2002).** Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**, 503-507
- Gallagher A.R., Cedzich A., Gretz N., Somlo S. and Witzgall R. (2000).** The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4017-4022
- Gallagher A.R., Hidaka S., Gretz N. and Witzgall R. (2002).** Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Cell. Mol. Life Sci* **59**, 682-693
- Gallagher A.R., Hoffmann S., Brown N., Cedzich A., Meruvu S., Podlich D., Feng Y., Könecke V., de Vries U., Hammes H.P., Gretz N. and Witzgall R. (2006).** A Truncated Polycystin-2 Protein Causes Polycystic Kidney Disease and retinal Degeneration in Transgenic Rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2719-2730
- Geng L., Okuhara D., Yu Z., Tian X., Cai Y., Shibasaki S. and Somlo S. (2006).** Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *Journal of Cell Science* **119**, 1383-1395
- Gershon P.D. and Khilko S. (1995).** Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *J. Immunol. Methods.* **183**, 65-76
- Gifford J.L., Walsh M.P. and Vogel H.J. (2007).** Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* **405**, 199-221

- Gilula N.B. and Satir P. (1972).** A Ciliary Membrane Specialization. *J. Cell Biol.* **53**, 494-509
- Goder V., Bieri C. and Spiess M. (1999).** Glycosilation can influence topogenesis of membrane proteins and reveals dynamic reorientation of nascent polypeptides within the translocon. *J. Cell. Biol.* **147**, 257-266
- González-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano A.E., Zotta E., Batelli M., Harris P.C., Reisin I.L., Arnout M.A. and Cantiello H.F. (2001).** Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease, is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci* **98**, 1182-1187
- Grantham J.J., Ye M., Gattone V.H. and Sullivan L.P. (1995).** In vitro fluid secretion by epithelium from polycystic kidneys. *J Clin Invest* **95**, 195-202
- Gratowski H., Lear J.D. and Degrado W.F. (2001).** Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 880-885
- Gritsch S., Neumaier K., Schmitt L. and Tampé R. (1995).** Engineered fusion molecules at chelator lipid interfaces imaged by reflection interference contrast microscopy (RICM). *Biosens. Bioelectron.* **10**, 805-812
- Gronwald W., Huber F., Grünewald P., Spörner M., Wohlegemuth S., Herrmann C. and Kalbitzer H.R. (2001).** Solution Structure of the Ras Binding Domain of the Protein Kinase Byr2 from *Schizosacharomyces pombe*. *Structure* **9**, 1029-1041
- Guan K.L. and Dixon J.E. (1991).** Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli*: An Improved Thrombin Cleavage and Purification Procedure of Fusion Proteins with Glutathione S-Transferase. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* **192**, 262-267
- Hackmann K., Markoff A., Qian F., Bogdanova N., Germino G.G., Pennekamp P., Dworniczak B.M., Horst J. and Gerke V. (2005).** A Splice form of polycystin-2, lacking exon 7, does not interact with polycystin-1. *Human Molecular Genetics* **14**, 3249-3262
- Haerri E., Loeffler W., Sigg H.P., Staehelin H. und Tamm C. (1963).** Ueber die Isolierung neuer Stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* DODGE. *Helv. Chim. Acta.* **46**, 1235-1243
- Hanahan D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanaoka K., Qian F., Boletta A., Bhunia A.K., Piontek K., Tsiokal L., Sukhatme V.P., Guggino W.B. and Germino G.G. (2000).** Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* **408**, 990-994
- Harris P.C. (1999).** Autosomal dominant polycystic kidney disease: clues to pathogenesis. *Human Molecular Genetics* **8**, 1861-1866
- Hartmann E., Rapoport T.A. and Lodish H.F. (1989).** Predicting the orientation of eucaryotic membrane spanning proteins. *Biochemistry* **86**, 5786-5790
- Hattula K., Furuholm J., Tikkanen J., Tanhuanpää K., Laakonen P. and Peränen J. (2006).** Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *Journal of Cell Science* **119**, 4866-4877
- Hayashi T., Mochizuki T., Reynolds D.M., Wu G., Cai Y. and Somlo S. (1997).** Characterization of the Exon Structure of the Polycystic Kidney Disease 2 gene (PKD2). *GENOMICS* **44**, 131-136
- Hengsakul M. and Cass A.E.G. (1997).** Alkaline phosphatase-Strep tag fusion protein binding to streptavidin: resonant mirror studies. *J. Mol. Biol.* **266**, 621-632
- Hidaka S., Könecke V., Osten L. and Witzgall R. (2004).** PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J. Biol. Chem.* **279**, 35009-35016
- Hoenderop J.G., van der Kemp A.W., Hartog A., van Os C.H., Willems P.H. and Bindels R.J. (1999).** The epithelial calcium channel, EcaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 488-492

- Hoffmann C. and Lohse M.J. (2006).** Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in lebenden Zellen: FIAsh-Methode. *BIOspektrum* **12**, 495-497
- Hölscher C., Bach U.C. and Dobberstein B. (2001).** Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *J. Biol. Chem.* **276**, 13388-13394
- Hong M., Tanaka K., Pan Z., Ma J. And You G. (2007).** Determination of the external loops and the cellular orientation of the N- and the C-termini of the human organic anion transporter hOAT1. *Biochem. J.* **401**, 515-520
- Horne W.A., Ellinor P.T., Inman I., Zhou M., Tsien R.W. and Schwartz T.L. (1993).** Molecular Diversity of Ca²⁺ Channel α_1 Subunits From the Marine Ray Discopyge ommata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3787-3791
- Hou X., Mrug M., Yoder B.K., Lefkowitz E.J., Kremmidiotis G., D'Eustachio P., Beier D.R. and Guay-Woodford, L.M. (2002).** Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest.* **109**, 533-540
- Hubbard S.J. (1998).** The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1382**, 191-206
- Hunziker W. and Fumey C. (1994).** A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.* **13**, 2963-2967
- Hyslop P.S.T., Ravine D. and Pei Y. (2003).** Genotype-Renal Function Correlation in Type 2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1164-1174
- Ikonen Elina (2001).** Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **13**, 470-477
- Janshoff A., Galla H.J. and Steinem C. (2000).** Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 4004-4032
- Jensen C.G., Poole C.A., McGlashan S.R., Marko M. and Issa Z.I. (2004).** Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biol. Int.*, **28**, 101-110.
- Jones H.M., Hamilton K.L. and Devor D.C. (2005).** Role of an S4-S5 Linker Lysine in the Trafficking of the Ca²⁺-activated K⁺ Channels IK1 and SK3*. *J. Biol. Chem.* **280**, 37257-37265
- Joyce C.W., Shelness G.S., Davis M.A., Lee R.G., Skinner K., Anderson R.A. and Rudel L.L. (2000).** ACAT1 and ACAT2 Membrane Topology Segregates a Serine Residue Essential for Activity to Opposite Sides of the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 3675-3687
- Jüschke C., Wächter A., Schwappach B. and Seedorf M. (2005).** SEC 18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **169**, 613-622
- Kappeler F., Klopfenstein D.R., Foguet M., Paccaud J.P. and Hauri H.P. (1997).** The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J. Biol. Chem.* **272**, 31801-31808
- Kapzan R. (2006).** Charakterisierung der Interaktion zwischen Polycystin-2 und anderen Proteinen (Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie an der Universität Regensburg unter Prof. Dr. R. Witzgall)
- Karlson P., Doenecke D. und Koolmann J. (1994).** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York (14. Auflage)*
- Kast C. and Grost P. (1997).** Topology Mapping of the Amino-terminal Half of Multidrug Resistance-associated Protein by Epitope Insertion and Immunofluorescence. *J. Biol. Chem.* **272**, 26479-26487
- Kay B.K., Williamson M.P. and Sudol M. (2000).** The importance of being proline: The interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**, 231-241

- Kim S.J., Rahbar R. and Hedge R.S. (2001).** Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 26132-26140
- Kimberling W.J., Kumar S., Gabow P.A., Kenyon J.B., Connolly C.J. and Somlo S. (1993).** Autosomal dominant polycystic kidney disease: Localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* **18**, 467-472
- Köttgen M., Benzing T., Simmen T., Tauber R., Buchholz B., Feliciangeli S., Huber T.B., Schermer B., Kramer-Zucker A., Höpker K., Simmen K.C., Tschuke C.C., Sandford R., Kim E., Thomas G. and Walz G. (2005).** Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *The EMBO Journal* **24**, 705-716
- Kopito R.R. (1999).** Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* **79**, S167-S173
- Koulen P., Cai Y., Geng L., Maeda Y., Nishimura S., Witzgall R., Ehrlich B.E. and Somlo S. (2002).** Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 191-197
- Kozminski K.G., Johnson K.A., Forscher P. and Rosenbaum J.L. (1993).** A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5519-5523
- Kretsinger R.H. (1987).** Calcium coordination and the calmodulin fold: divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 499-510
- Krogh, A., Larsson B., von Heijne G. and Sonnhammer E.L. (2001).** Predicting transmembrane topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580
- Kuge O., Dascher C., Orci L., Rowe T., Amherdt M., Plutner H., Ravazzola M., Tanigawa G., Rothman J.E. and Balch W.E. (1994).** Sar1 Promotes Vesicle Budding from the Endoplasmic Reticulum but Not Golgi Compartments. *J. Cell Biol.* **125**, 51-65
- Kyte J. and Doolittle R.F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lakkis M. and Zhou J. (2003).** Molecular complexes formed with polycystins. *Nephron Exp Nephrol* **93**, e3-e8
- Lakowicz J.R. (1999).** Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Dordrecht, London, Moscow, New York (USA), second edition*
- Lehtonen S., Ora A., Olkkonen V.M., Geng L., Zerial M., Somlo S. and Lehtonen E. (2000).** In Vivo Interaction of the Adapter Protein CD2-associated Protein with the Type 2 Polycystic Kidney Disease Protein, Polycystin-2. *J. Biol. Chem.* **275**, 32888-32893
- Leroux M.R. (2007).** Taking Vesicular Transport to the Cilium. *Cell* **129**, 1041-1043
- Lewis S.E., Listenberger L.L., Ory D.S. and Schaffer J.E. (2001).** Membrane Topology of the Murine Fatty Acid Transport Protein 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 37042-37050
- Li H.P., Geng L., Burrow C.R. and Wilson P.D. (1999).** Identification of phosphorylation sites in the PKD1-encoded protein C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 356-363
- Li M.X., Chandra M., Pearlstone J.R., Racher K.I., Trigo-Gonzalez G., Borgford T., Kay C.M. and Smillie L.B. (1994).** Properties of isolated recombinant N and C domains of chicken troponin C. *Biochemistry* **33**, 917-925
- Li S.W., Westwick J. and Poll C.T. (2002)a.** Receptor-operated Ca²⁺ influx channels in leukocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* **23**, 63-70
- Li Q., Liu Y., Zhao W. and Chen X.-Z. (2002)b.** The calcium-binding EF-hand in polycystin-L is not a domain for channel activation and ensuing inactivation. *FEBS Letters* **516**, 270-278

- Li Q., Dai Y., Guo L., Liu Y., Hao C., Wu G., Basora N., Michalak M. and Chen X.-Z. (2003)a.** Polycystin-2 Associates with Tropomyosin-1, an Actin Microfilament Component. *J. Mol. Biol.* **325**, 949-962
- Li Q., Shen P.Y., Wu G. and Chen X.-Z. (2003)b.** Polycystin-2 Interacts with Troponin I, an Angiogenesis Inhibitor. *Biochemistry* **42**, 450-457
- Li Q., Montalbetti N., Shen P.Y., Dai X.Q., Cheeseman C.I., Karpinsky E., Wu G., Cantiello H.F., and Chen X.Z. (2005)b.** Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Human Molecular Genetics* **14**, 1587-1603
- Li Q., Montalbetti N., Wu Y., Ramos A., Raychowdhury M.K., Chen X.-Z., Cantiello H.F. (2006).** Polycystin-2 Cation Channel Function Is under the Control of Microtubular Structures in Primary Cilia of Renal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 37566-37575
- Li Y., Wright J.M., Qian F., Germino G.G. and Guggino W.B. (2005)c.** Polycystin 2 Interacts with Type I Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor to Modulate Intracellular Ca²⁺ Signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 41298-41306
- Li X., Luo Y., Starremans P.G., McNamara C.A., Pei Y. And Zhou J. (2005)a.** Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *NATURE CELL BIOLOGY* **7**, 1202-1212
- Liang J.O. and Kornfeld S. (1997).** Comparative activity of ADP-ribosylation factor family members in the early steps of coated vesicle formation on rat liver Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **272**, 4141-4148
- Lin S., Cheng D., Liu M., Chen J. and Chang T. (1999).** Human Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase-1 in the Endoplasmic Reticulum Contains Seven Transmembrane Domains. *J. Biol. Chem.* **274**, 23276-23285
- Linstedt A.D. and Hauri H.P. (1993).** Giantin, a Novel Conserved Golgi Membrane Protein Containing a Cytoplasmic Domain of at Least 350 kDa. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 679-693
- Liu Y.C., Wang C.M. and Hsiung K.P. (2001).** Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay. *Anal Biochem* **299**, 130-135
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P. and Darnell J. (1996).** Molekulare Zellbiologie, *Walter de Gruyter · Berlin · New York (2. Auflage)*
- Lottspeich F. und Zorbach H. (1998),** Bioanalytik, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin*
- Luo Y., Vassilev P.M., Li X., Kawanabe Y. And Zhou J. (2003).** Native polycystin-2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2600-2607
- Ma D., Zerangue N., Lin Y.F., Collins A., Yu M., Jan Y.N. and Jan L.Y. (2001).** Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-319
- Magistroni R., He N., Wang K., Andrei R., Johnson A., Gabow P., Dicks E., Parfrey P., Torra R., San-Millan J.L., Coto E., van Dijk M., Breuning M., Peters D., Bogdanova N., Ligabue G., Albertazzi A., Hateboer N., Demetriou K., Pierides A., Deltas C., George-Hyslop P.S.T., Ravine D. and Pei Y. (2003).** Genotype-Renal Function Correlation in Type 2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1164-1174
- Martin T.F. (2001).** Pi(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 493-499
- Martinez J.R. and Grantham J.J. (1995).** Polycystic kidney disease: etiology, pathogenesis, and treatment. *Disease-a-Month* **XLI**
- Martinez-Maza R., Poyatos I., López-Corcuera B., Nunez E., Giménez C., Zafra F. and Aragón C. (2001).** The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* **276**, 2168-2173
- Martinez-Menarguez J.A., Geuze H.J., Slot J.W. and Klumperman J. (1999).** Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* **98**, 81-90

- Matter K., Hunziker W. and Mellman I. (1992).** Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine dependent targeting determinants. *Cell* **71**, 741-753
- Matter K. and Mellman I. (1994).** Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 545-554
- Matter K., Yamamoto E.M. and Mellman I. (1994).** Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **126**, 991-1004
- McDonnell J.M. (2001).** Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 572-577
- Meder D., Shevchenko A., Simons K. and Fullekrug J. (2005).** Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells. *J. Cell. Biol.* **168**, 303-313
- Meindl-Beinker N.M., Lundin C., Nilsson I., White S.H. and von Heijne G. (2006).** Asn- and Asp-mediated interactions between transmembrane helices during translocon-mediated membrane protein assembly. *EMBO Rep.* **7**, 1111-1116
- Milenkovic V.M., Rivera A., Horling F. and Weber B.H.F. (2007).** Insertion and Topology of Normal and Mutant Bestrophin-1 in the Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Biol. Chem.* **282**, 1313-1321
- Mochizuki T., Wu G., Hayashi T., Xenophontos S.L., Veldhuisen B., Saris J.J., Reynolds D.M., Cai Y., Gabow P.A., Pierides A., Kimberling W.J., Breuning M.H., Deltas C.C., Peters D.J. and Somlo S. (1996).** PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* **272** (5266), 1339-1342
- Modrow S. und Falke D. (1998).** Molekulare Virologie, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin (1. korrigierter Nachdruck)*
- Montalbetti N., Li Q., Wu Y., Chen X.-Z. and Cantiello H.F. (2007).** Polycystin-2 cation channel function in the human synytiotrophoblast is regulated by microtubular structures. *J. Physiol.* **579.3**, 717-728
- Morgenstern J.P. and Land H. (1990).** Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3587-3596
- Morinaga N., Tsai S.C., Moss J. and Vaughan M. (1996).** Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (arf) 1 and arf3 that contains a sec7-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12856-12860
- Moy G.W., Mendoza L.M., Schulz J.R., Swanson W.J., Glabe C.G. and Vaquier V.D. (1996).** The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J. Cell. Biol.* **133**, 809-817
- Morgan D., Eley L., Sayer J., Strachan T., Yates L.M., Craighead A.S. and Goodship J.A. (2002).** Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Hum Mol Genet* **11**, 3345-3350
- Mulugeta S. and Beers M.F. (2003).** Processing of Surfactant Protein C Requires a Type II Transmembrane Topology Directed by Juxtamembrane Positively Charged residues. *J. Biol. Chem.* **278**, 47979-47986
- Murshid A. and Presley J.F. (2004).** ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol Life Sci* **61**, 133-145
- Muth T.R. and Caplan M.J. (2003).** Transport Protein Trafficking in Polarized Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 333-366
- Nachury M.V., Loktev A.V., Zhang Q., Westlake C.J., Peränen J., Merdes A., Slusarski D.C., Scheller R.H., Bazan J.F., Sheffield V.C. and Jackson P.K. (2007).** A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell* **129**, 1201-1213

- Nakai K. and Horton P (1999).** PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34-35
- Nakai T., Yamasaki A., Sakaguchi M., Kosaka K., Mihara K., Amaya Y. and Miura S. (1999).** Membrane Topology of Alzheimer's Disease-related Presenilin 1. *J. Biol. Chem.* **274**, 23647-23658
- Nauli S.M., Alenghat F.J., Luo Y., Williams E., Vassilev P., Li X., Elia A.E.H., Lu W., Brown E.M., Quinn S.J., Ingber D.E. and Zhou J. (2003).** Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics* **33**, 129-137
- Newby L.J., Streets A.J., Zhao Y., Harris P.C., Ward C.J. and Ong A.C.M. (2002).** Identification, characterization and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 20763-20773
- Nieba L., Nieba-Axmann S.E., Persson A., Hamalainen M., Edebratt F., Hansson A., Lidholm J., Magnusson K., Karlsson H.F. and Pluckthun A. (1997).** BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Anal. Biochem.* **252**, 217-228
- Nilsson I., Witt S., Kiefer H., Mingarro I. and von Heijne G. (2000).** Distant downstream sequence determinants can control N-tail translocation during protein insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 6207-6213
- Nilius B., Prenen J., Hoenderop J.G., Vennekens R., Hoefs S., Weidema A.F., Droogmanns G. and Bindels R.J. (2002).** Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels EcaC1 and EcaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J Biol Chem* **277**, 30852-30858
- Nims N., Vassmer D. and Maser R.L. (2003).** Transmembrane Domain Analysis of Polycystin-1, the Product of the Polycystic kidney Disease-1 (PKD1) Gene: Evidence for 11 Membrane-Spanning Domains. *Biochemistry* **42**, 13035-13048
- Nufer O., Kappeler F., Guldbransen S. and Hauri H.P. (2003).** ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains. *Journal of Cell Science* **116**, 4429-4440
- Obermüller N., Gallagher A.R., Cai Y., Gassler N., Gretz N., Somlo S. and Witzgall R. (1999).** The rat Pkd2 protein assumes distinct subcellular distributions in different organs. *Am. J. Physiol.* **277**, 914-925
- Obermüller N., Cai Y., Kränzlin B., Thomson R.B., Gretz N., Kriz W., Somlo S. and Witzgall R. (2002).** Altered Expression Pattern of Polycystin-2 in Acute and Chronic Renal Tubular Diseases. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1855-1864
- Ohki S., Ikura M. and Zhang M. (1997).** Identification of Mg²⁺-binding sites and the role of Mg²⁺ on target recognition by calmodulin. *Biochemistry* **36**, 4309-4316
- Oka T. and Nakano A. (1994).** Inhibition of GTP hydrolysis by Sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the ER-to-Golgi transport in yeast. *J. Cell Biol.* **124**, 425-434
- Ong A.C.M., Ward C.J., Butler R.J., Biddolph S., Bowker C., Torra R., Pei Y. and Harris P.C. (1999).** Coordinate Expression of the Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Proteins, Polycystin-2 And Polycystin-1, in Normal and Cystic Tissue. *AJP* **154**, 1721-1729
- Ong A.C.M. and Wheatley D.N. (2003).** Polycystic kidney disease-the ciliary connection. *Lancet* **361**, 774-776
- Orci L., Tagaya M., Amherdt M., Perrelet A., Donaldson J.G., Lipincott-Schwartz J., Klausner R.D. and Rothmann J.E. (1991).** Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* **64**, 1183-1195
- Ott C.M. and Lingappa V.R. (2004).** Signal sequences influence membrane integration of the prion protein. *Biochemistry* **43**, 11973-11982
- Otte S. and Barlowe C. (2002).** The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO Journal* **21**, 6095-6104

- Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. and Gray T. (1995).** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423
- Parnell S.C., Magenheimer B.S., Maser R.L., Rankin C.A., Smine A., Okamoto T. and Calvet J.P. (1998).** The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 625-631
- Pazour G.J., Dickert D.L., Vucica Y., Seeley E.S., Rosenbaum J.L., Witman G.B. and Cole D.G. (2000).** Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* **151**, 709-718
- Pazour G.J., Baker S.A., Deane J.A., Cole D.G., Dickert B.L., Rosenbaum J.L., Witman G.B. and Besharse J.C. (2002).** The intraflagellar transport protein, Ift88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* **157**, 103-113
- Pennekamp P., Bogdanova N., Wilda M., Markoff A., Hameister A. and Horst J. (1998).** Characterization of the murine polycystic kidney disease (Pkd2) gene. *Mammalian Genome* **9**, 749-752
- Pepperkok R., Lowe M., Burke B. and Kreis T.E. (1998).** Three distinct steps in transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the ER to the cell surface in vivo with differential sensitivities to GTP γ S. *Journal of Cell Science* **111**, 1877-1888
- Peters D.J.M. and Sandkuijl L.A. (1992).** Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. In Contributions to Nephrology: Polycystic Kidney Disease, Breuning M.H., Devoto M. and Romeo G. (Karger: Basel) **97**, 128-139
- Pierce (2005)a.** Applications Handbook and Catalog for 2005/2006. *Pierce Biotechnology, Inc., 2005. Printed in the U.S.A.; Perbio Science Deutschland GmbH, Adenauerallee 113, 53113 Bonn*
- Pierce (2005)b.** Avidin-Biotin Products (2005). *Printed in the U.S.A.; Perbio Science Deutschland GmbH, Adenauerallee 113, 53113 Bonn*
- Pierce Chemical Company (2001).** Instruction-Manual für EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (21331), page 1-3. 3747 N. Meridian Road, P.O. Box 117, Rockford, IL 61105; *Perbio Science Deutschland GmbH, Adenauerallee 113, 53113 Bonn*
- Poole C.A., Flint M.H. and Beaumont B.W. (1985).** Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil.* **5**, 175-193
- Pornillos O., Chen Y.J., Chen A.P. and Chang G. (2005).** X-ray structure of the EmrE multidrug transporter in complex with a substrate. *Science* **310**, 1950-1953
- Praetorius H.A. and Spring K.R. (2001).** Bending the MDCK Cell Primary Cilium Increases Intracellular Calcium. *J. Membrane Biol.* **184**, 71-79
- Praetorius H.A. and Spring K.R. (2003).** The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 517-520
- Praetorius H.A. and Spring K.R. (2004).** A PHYSIOLOGICAL VIEW OF THE PRIMARY CILIUM. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 09.1-09.15
- Qian F. and Germino G.G. (1997).** "Mistakes happen": somatic mutation and disease. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 1000-1005
- Qian F., Germino F.J., Cai Y., Zhang X., Somlo S. and Germino G.G. (1997).** PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature Genetics* **16**, 179-183
- Reddy P.S. and Corley R.B. (1998).** Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays* **20**, 546-554

- Reeders S.T., Breuning M.H., Davies K.E., Nicholls R.D., Jarman A.P., Higgs D.R., Pearson P.L. and Weatherall D.J. (1985).** A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* **317**, 542-544
- Rehm H. (2006).** Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. *Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München (Spektrum Akademischer Verlag ist ein Imprint der Elsevier GmbH) [5. Auflage]*
- Reid R.E. (1990).** Synthetic fragments of calmodulin calcium-binding site III. A test of the acid pair hypothesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 5971-5976
- Reinstein J., Vetter I.R., Schlivhting I., Rösch P., Wittinghofer A. and Goody R.S. (1990).** Fluorescence and NMR Investigations on the Ligand Binding Properties of Adenylate Kinases. *Biochemistry* **29**, 7440-7450
- Renna L., Hanton S.L., Stefano G., Bortolotti L., Misra V. and Brandizzi F. (2005).** Identification and characterization of AtCASP, a plant transmembrane Golgi matrix protein. *Plant Molecular Biology* **58**, 109-122
- Reynolds D.M., Hayashi T., Cai Y.Q., Veldhuisen B., Watnick T., Lens X., Mochizuki T., Qian F., Maeda Y., Li L., Fossdal R., Coto E., Wu G.Q., Breuning M., Germino G., Peters D. and Somlo S. (1999).** Aberrant splicing in the PKD2 gene as a cause of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2342-2351
- Ringo D.L. (1967).** Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **33**, 543-571
- Rogers K.K., Wilson P.D., Snyder R.W., Zhang X., Guo W., Burrow C.R. and Lipschutz J.H. (2004).** The exocyst localizes to the primary cilium in MDCK cells. *BBRC* **319**, 138-143
- Roth K.E., Rieder C.L. and Bowser S.S. (1988).** Flexible substratum technique for viewing cells from the side: Some in vivo properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelia. *J. Cell. Sci.* **89**, 457-466
- Rothman J.E. and Fine R.E. (1980).** Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 780-784
- Rundle D.R., Gorbsky G. and Tsiokas L. (2004).** PKD2 Interacts and Co-localizes with mDial to Mitotic Spindles of Dividing Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 29728-29739
- Satir and Gilula (1970).** The cell junction in a lamellibranch gill ciliated epithelium. *J. Cell. Biol.* **47**, 468-487
- Sato K. and Nakano A. (2007).** Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters* **581**, 2076-2082
- Sauerbrey G. (1959).** Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **155**, 206-222
- Scheffers M.S., Le H., van der Brent P., Leonhard W., Prins F., Spruit L., Breuning M.H., de Heer E. and Peters D.J.M. (2002).** Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells. *Human Molecular Genetics* **11**, 59-67
- Schein C.H. and Noteborn M.H.M. (1988).** Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology* **6**, 291-294
- Schiebler T.H., Schmidt W. und Zilles K. (1997).** Anatomie. *Springer-Verlag Berlin · Heidelberg · New York (7. Auflage)*
- Schmidt T.G.M., Koepke J., Frank R. and Skerra A. (1996).** Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766
- Schmidt R.F. and Thews G. (1997).** Physiologie des Menschen. *Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokyo, (27. Auflage)*

- Schuhmacher R. (1990).** Die Quarzmikrowaage: Eine neue Meßtechnik zur in-situ-Untersuchung des Phasengrenzgebietes fest/flüssig. *Angew. Chem.* **102**, 347-361
- Schwartz E.A., Leonard M.L., Bizios R. and Bowser S.S. (1997).** Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am. J. Physiol.* **272**, 132-138
- Shaw G.S., Hodges R.S. and Sykes B.D. (1990).** Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: 1H NMR structural evidence. *Science* **249**, 280-283
- Shnek D.R., Pack D.W., Sasaki D.Y. and Arnold F.H. (1994).** Specific Protein Attachment to Artificial Membranes via Coordination to Lipid-Bound Copper (II). *Langmuir* **10**, 2382-2388
- Sigal G.B., Bamdad C., Barberis A., Strominger J. and Whitesides G.M. (1996).** A self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **68**, 490-497
- Sigma-Aldrich Co. (2006).** Biochemikalien, Reagenzien und Kits für die Life Science Forschung (Katalog für 2006/2007). *SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*
- Simmen T., Aslan J.E., Blagoveshchenskaya A.D., Thomas L., Wan L., Xiang Y., Feliciangeli S.F., Hung C.-H., Crump C.M. and Thomas G. (2005).** PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis (2005). *EMBO J.* **24**, 717-729
- Simonsen A., Wurmser A.E., Emr S.D. and Stenmark H. (2001).** The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 485-492
- Singer S.J. (1990).** The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu Rev. Cell Biol.* **6**, 247-296
- Sipos L. and von Heijne G. (1993).** Predicting the topology of eucaryotic membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1333-1340
- Steinem C. (2002).** Die Masse macht's Der Schwingquarz in der Bioanalytik. *Blick in die Wissenschaft Forschungsmagazin der Universität Regensburg* **14**, 12-17 und 65
- Stockklausner C. and Klöcker N. (2003).** Surface Expression of Inward Rectifier Potassium Channels Is Controlled by Selective Golgi Export. *J. Biol. Chem.* **278**, 17000-17005
- Streets A.J., Moon D. J., Kane M.E., Obara T. and Ong A.C.M. (2006).** Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 *in vivo* and *in vitro*. *Human Molecular Genetics* **15**, 1465-1473
- Strous G.J., Berger E.G., van Kerkhof P., Bosshart H., Berger B. and Geuze H.J. (1991).** Brefeldin A induces microtubule-dependent fusion of galactosyltransferase-containing vesicles with the rough endoplasmic reticulum. *Biol. Cell.* **71**, 25-31
- Sudol M., Chen H.I., Bougeret C., Einbond A. and Bork P. (1995).** Characterization of a novel protein-binding molecule-The WW domain. *FEBS Letters* **369**, 67-71
- Sutters M. (2006).** The Pathogenesis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol* **103**, e149-e155
- Taylor V., Zraggen C., Naef R. and Suter U. (2000).** Membrane Topology of Peripheral Myelin Protein 22. *Journal of Neuroscience Research* **62**, 15-27
- Theret I., Baladi S., Cox J.A., Sakamoto H. and Craescu C.T. (2000).** Sequential calcium binding to the regulatory domain of calcium vector protein reveals functional asymmetry and a novel mode of structural rearrangement. *Biochemistry* **39**, 7920-7926
- Thomas D.C., Brewer C.B. and Roth M.G. (1993).** Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* **268**, 3313-3320

- Thomas G. (2002).** Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 753-766
- Tie J.K., Nicchitta C., von Heijne G. and Stafford D.W. (2005).** Membrane Topology mapping of Vitamin K Epoxide Reductase by *in Vitro* Translation/Cotranslocation. *J. Biol. Chem.* **280**, 16410-16416
- Traxler B., Boyd D. and Beckwith J. (1993).** The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins. *J. Membr. Biol.* **132**, 1-11
- Tsiokas L., Kim E., Arnould T., Sukhatme V.P. and Walz G. (1997).** Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6965-6970
- Tsiokas L., Arnould T., Zhu C., Kim E., Walz G. and Sukhatme V.P. (1999).** Specific association of the gene product of *PKD2* with the TRPC1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3934-3939
- Turk E. and Wright E.M. (1997).** Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J. Membr. Biol.* **159**, 1-20
- Yan S., Sanders J., Xu J., Zhu Y., Contractor A. and Swanson G.T. (2004).** A C-Terminal Determinant of GluR6 Kainate Receptor Trafficking. *The Journal of Neuroscience* **24**, 679-691
- Yamaguchi T., Apse M. P., Shi H. and Blumwald E. (2003).** Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12510-12515
- Yoshimura S.I., Egerer J., Fuchs E., Haas A.K. and Barr F.A. (2007).** Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation. *The Journal of Cell Biology* **178**, 363-369
- van Geest M. and Lolkema J.S. (2000).** Membrane Topology and Insertion of Membrane Proteins: Search for Topogenic Signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 13-33
- Vassilev P.M., Guo L., Chen X.Z., Segal Y., Peng J.B., Basora N., Babakhanlou H., Cruger G., Kanazirska M., Ye C., Brown E.M., Hediger M.A. and Zhou J. (2001).** Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca²⁺ homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 341-350
- Veldhuisen B., Saris J.J., de Haij S., Hayashi T., Reynolds D.M., Mochizuki T., Elles R., Fossdal R., Bogdanova N., van Dijk M.A., Coto E., Ravine D., Nrby S., Verellen-Dumoulin C., Breuning M.H., Somlo S. and Peters D.J.M. (1997).** A Spectrum of Mutations in the Second Gene for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (*PKD2*). *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 547-555
- von Heijne G. (1992).** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**, 487-494
- von Heijne G. (2006).** Membrane-protein topology. *Nature Reviews/Molecular cell Biology* **7**, 909-918
- Webber W.A. and Lee J. (1975).** Fine structure of mammalian renal cilia. *Anat. Rec.* **182**, 339-343
- Wheatley D.N. and Bowser S.S. (2000).** Length control of primary cilia: analysis of monociliate and multiciliate PtK1 cells. *Biol. Cell.* **92**, 573-582
- Wieland F.T., Gleason M.L., Serafini T.A. and Rothman J.E. (1987).** The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**, 289-300
- Williams M.E., Marubio L.M., Deal C.R., Hans M., Brust P.F., Philipson L.H., Miller R.J., Johnson E.C., Harpold M.M. and Ellis S.B. (1994).** Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* **269**, 22347-22357
- Wilson P.D., Sherwood A.C., Palla K., Du J., Watson R. and Norman J.T. (1991).** Reversed polarity of Na-K-ATPase: mislocalization to apical plasma membrane. *Am J Physiol Fluid Electrolyte Physiol* **260**, F420-F430

- Wilson P.D., Devuyst O., Li X., Gatti L., Falkenstein D., Robinson S., Fambrough D. and Burrow C.R. (2000).** Apical plasma membrane mispolarization of Na-K-ATPase in polycystic kidney disease epithelia is associated with aberrant expression of the β_2 isoform. *Am J Pathol* **156**, 253-268
- Wilson P.D. (2001).** Polycystin: New Aspects of Structure, Function, and Regulation. *J Am Soc Nephrol* **12**, 834-845
- Wilson P.D. (2004).** Polycystic Kidney Disease. *The New England Journal of Medicine* **350**, 151-160
- Wink, M (2006).** An Introduction to Molecular Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany*
- Witzgall R. (2005).** Polycystin-2-an intracellular or plasmamembrane channel? *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* **371**, 342-347
- Wu G., D'Agati V., Cai Y., Markowitz G., Park J.H., Reynolds D.M., Maeda Y., Le T.C., Hou H., Kucherlapati R., Edelman W. and Somlo S. (1998).** Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* **93**, 177-188
- Wu Y., Cai X.Q., Li Q., Chen C.X., Mai W., Hussain Z., Long W., Montalbetti N., Li G., Glynne R., Wang S., Cantiello H.F., Wu G., Chen X.Z. (2006).** Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Human Molecular Genetics* **15**, 3280-3292
- Xu G.M., Gonzalez-Perret S., Essafi M., Timpanaro G.A., Montalbetti N., Arnaout N.A. and Cantiello H.F. (2003).** Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J. Biol. Chem.* **278**, 1457-1462
- Yoder B.K., Hou X. and Gay-Woodford L.M. (2002).** The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2508-2516
- Zen K.H., Consler T.G. and Kaback H.R. (1995).** Insertion of polytopic membrane protein lactose permease occurs by multiple mechanisms. *Biochemistry* **34**, 3430-3437
- Zhang J.T., Chen M., Han E. and Wang C. (1998).** Dissection of de novo membrane insertion activities of internal transmembrane segments of ATP-binding-cassette transporters: toward understanding topological rules of membrane assembly of polytopic membrane proteins. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 853-863
- Zhou F.X., Merianos H.J., Brunger A.T. and Engelman D.M. (2001).** Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2250-2255
- Zot H.G. and Potter J.D. (1982).** A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} -sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.* **257**, 7678-7683

7.2 Zitierte Internetadressen

<http://www.neb.com-FAQs> for pMAL Protein Fusion and Purification System, E. coli, New England Biolabs. New England Biolabs GmbH, Brünigstr. 50, Geb.810, 65926 Frankfurt a. M., Deutschland

http://www.fz-juelich.de/zch/icp_oes. Forschungszentrum Jülich, Zentralabteilung für chemische Analysen (Dr. habil. J. Sabine Becker), 52425 Jülich

7.3 Zitierte Personen

Prof. Dr. R. Witzgall/Dr. K. Babinger/Dr. J. Prestel (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)/Dr. B. Oswald (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe):
Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Regensburg

Dr. F. Schumann/Dr. C. Schreier:

Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer), Universität Regensburg

Prof. Dr. C. Steinem/Sabine Bosk:

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen

Prof. Dr. B. König:

Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg

Prof. Dr. R. Deutzmann:

Biochemie I, Universität Regensburg

Prof. Dr. M. Thomm/Dr. H. Huber:

Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

Prof. Dr. R. Sterner:

Institut für Biophysik und physikalische Biochemie (Biochemie II), Universität Regensburg

8. Publikationsverzeichnis

8.1 Paper

Helen Hoffmeister, Karin Babinger, Sonja Gürster, Anna Cedzich, Uwe de Vries, Anne Rascle, Ralph Witzgall (2008). Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane (eingereicht).

Helen Hoffmeister, Lissy Besl, Anne Rascle, Ralph Witzgall (2008). Determining the topology of the cation channel PC2 (in Arbeit).

Helen Hoffmeister, Frank Schumann, Elisabeth Besl, Patrick Babinger, Hans-Robert Kalbitzer, Ralph Witzgall (2008). Functional and structural characterization of an EF-hand domain in PC2 (in Arbeit).

8.2 Kongresse

29. – 31. März 2007: Postervorstellung (Poster-Nr.: 50) am 58. Mosbacher Kolloquium in Mosbach/Baden (Deutschland)

Postertitel: Determining the topology of Polycystin-2 and identification of a novel putative export signal (Helen Andrea Hoffmeister, Elisabeth Besl, Anne Rascle and Ralph Witzgall)

31. Oktober 2007 - 5. November 2007: Vortrag (Nr.: F FC 056) bei der Renal Week (ASN) in San Francisco, CA USA

Thema des Vortrags: Topology of Polycystin-2 and Identification of a Novel Putative Export Signal (Helen Hoffmeister, Elisabeth Besl, Anne Rascle and Ralph Witzgall)

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Helen Hoffmeister
geboren am 24. Februar 1979 in Schweinfurt
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985-1989	Grund- und Verbandsschule Gochsheim
1989-1998	Celtis-Gymnasium Schweinfurt
1998	Abitur

Studium:

1998-2003	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
2002	Diplomprüfung in den Fächern: - Molekularbiologie/Humangenetik (Hauptfach) - Virologie (NF)
Okt. 2002- Juni 2003	Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg; AG Prof. Dr. Dr. K. H. Seifart: <i>Vergleichende Analyse des Polymerase III- Initiations- und Elongationskomplexes am VA I-Gen</i>
Sept. 2003- Nov. 2007	Promotion am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg; Prof. Dr. med. R. Witzgall: <i>Struktur- und Funktionsanalyse von Polycystin-2</i>
Seit Jan. 2008	angestellt bei Prof. Dr. G. Längst (Biochemie III) an der Universität Regensburg

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Helen Andrea Hoffmeister, geboren am 24. Februar 1979 in Schweinfurt, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Struktur- und Funktionsanalyse von Polycystin-2“

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literatur- bzw. Personenzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Regensburg, November 2008

.....

(Helen Hoffmeister)