

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung  
neuer Interaktionspartner des renalen ROMK-Kaliumkanals**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich für Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Dipl.-Biol. Florian Bundis  
aus Hamburg

Frankfurt am Main 2006  
(DF1)

vom Fachbereich für Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Andreas E. Busch  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann  
Datum der Disputation: 20.11.2006

Für Claudia

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Ionenkanäle, Transporter und Pumpen	1
1.2	Kaliumkanäle	5
1.3	Regulatorische Kanaluntereinheiten	7
1.4	Einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle und ihre physiologische Bedeutung	9
1.5	ROMK: Molekularbiologie, Struktur und Funktion	10
1.6	Regulation von ROMK	13
1.7	Fragestellung und methodischer Ansatz	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien	18
2.2	Hefestämme	18
2.3	Bakterienstämme	19
2.4	Zelllinien	19
2.5	Antikörper	19
2.6	Genetische Konstrukte	20
2.7	Molekularbiologische Methoden	22
2.7.1	Medien für die Anreicherung von Bakterien	22
2.7.2	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	22
2.7.3	Elektroporation	23
2.7.4	Amplifikation und Präparation von Plasmiden	23
2.7.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
2.7.6	Restriktionsverdau von DNS	24
2.7.7	Herstellung von <i>Blunt Ends</i>	24
2.7.8	Dephosphorylierung	25
2.7.9	DNS-Agarosegelelektrophorese	25
2.7.10	Ligation	25
2.7.11	Konstruktion von Oligonukleotid-Starter-Molekülen ( <i>Primern</i> )	26
2.7.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.7.13	Kolonie-PCR	27
2.7.14	TOPO-Klonierung	27
2.7.15	DNS-Sequenzierung	28
2.7.16	Vergleich und Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen	28
2.7.17	cRNS-Synthese	29
2.7.18	cRNS-Agarosegelelektrophorese	29
2.8	Hefe-Zwei-Hybrid-System	29
2.8.1	Hefemedien	32
2.8.2	Amplifikation einer cDNS-Bibliothek	33
2.8.3	Kleine Hefetransformation	34
2.8.4	Große Hefetransformation	34
2.8.5	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest	35
2.8.6	Plasmidpräparation aus Hefe	35
2.9	Zellkultur	36
2.10	Proteinbiochemische Methoden	37
2.10.1	Koimmunpräzipitation	37
2.10.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.10.3	Western-Transferanalyse (Western-Blot)	38
2.11	Immunfluoreszenz	39
2.12	Elektrophysiologische Methoden	40
2.12.1	Lösungen	41
2.12.2	Oozytenpräparation	41
2.12.3	Injektion von cRNS	41
2.12.4	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	42
2.13	Oberflächenexpressionsanalyse	43
2.14	Datenanalyse	44

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Validierung des modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	45
3.2	Suche nach neuen Interaktionspartnern des ROMK-Kanalproteins mit Hilfe des modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	47
3.3	Charakterisierung ausgewählter Interaktionspartner anhand von Literaturangaben.....	50
3.3.1	Golgin-160.....	50
3.3.2	PP2A B56 $\beta$ .....	52
3.3.3	GRB7.....	53
3.3.4	NRF2 & CDR62.....	55
3.3.5	Proteine mit unbekannter Funktion.....	57
3.4	Funktionelle Charakterisierung von Golgin-160.....	58
3.4.1	Koimmunpräzipitation von ROMK und Golgin-160.....	58
3.4.2	Immunzytochemische Lokalisation.....	60
3.4.3	Elektrophysiologische Untersuchungen.....	62
3.4.4	Pharmakologische Untersuchungen.....	69
3.4.5	Oberflächenexpression.....	71
3.4.6	Vergleich der Wirkungen von Golgin-160 und GM130.....	74
3.4.7	Bindungsstudien mit ausgewählten ROMK-Bartter-Mutanten.....	75
3.4.8	Regulation von Golgin-160 durch SGK1.....	76
3.5	Charakterisierung weiterer Interaktionspartner von ROMK.....	77
3.5.1	PP2A B56 $\beta$ .....	78
3.5.2	GRB7.....	79
3.5.3	NRF2 & CDR62.....	81
3.5.4	Proteine mit unbekannter Funktion.....	82
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1	Golgin-160.....	87
4.2	PP2A B56 $\beta$ .....	95
4.3	GRB7.....	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>129</b>
7.1	Vektoren.....	129
7.2	Genetische Konstrukte für die Expression in Hefe.....	129
7.3	Genetische Konstrukte für die <i>in vitro</i> Synthese von cRNS.....	131
7.4	Genetische Konstrukte für die Expression in Säugerzellen.....	132
7.5	Primer für die Klonierung.....	133
7.6	Primer für die Sequenzierung.....	134
7.7	Abkürzungsverzeichnis.....	136
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>139</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>140</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>141</b>

## 1 Einleitung

Die Ausbildung biologischer Membranen war die Voraussetzung für die Entstehung lebender Zellen. Die Zellmembran ermöglicht die Aufrechterhaltung eines spezifischen, intrazellulären Milieus, sowie eines gerichteten Stoff-, Energie- und Informationsaustausches der Zelle mit ihrer Umgebung. Bei eukaryotischen Zellen sind zudem die einzelnen Organellen, wie Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum durch Membranen von einander getrennt. Die Phospholipidbausteine der biologischen Membranen sind amphiphil, d.h. sie bestehen aus einem wasserlöslichen, hydrophilen und einem fettlöslichen, lipophilen Anteil. Die hydrophilen Anteile sind den wäßrigen Phasen innerhalb und außerhalb der Zelle zugewandt, während die lipophilen Bereiche zueinander ausgerichtet sind und das Innere der Lipiddoppelschicht bilden. Das wasserabweisende Innere der Zellmembran stellt für die meisten Substanzen eine Barriere dar und kann nur von fettlöslichen Molekülen, unpolaren Gasen wie Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie kleinen Molekülen wie Harnstoff frei durchdrungen werden. Diese schützende Barrierewirkung der Zellmembran stellt damit für die Zelle ein potientes Problem dar, da sie auch ein sehr effektives Hindernis für die Versorgung der Zelle mit wichtigen Nahrungs-, Bau- und Betriebsstoffen wie Glukose, Aminosäuren und geladenen, anorganischen Ionen ist.

Dieses Problem hat die Zelle durch die Entwicklung von Transportsystemen gelöst, die die verschiedenen Moleküle durch die Membran schleusen. Der Transport von Substanzen kann hierbei entweder rein passiv durch Diffusion, d.h. entlang dem Gefälle eines Konzentrationsgradienten, oder aber gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen. Für den letzteren, aktiven Transport muß Energie aufgewendet werden.

Die Aufrechterhaltung eines bestimmten Ionenmilieus im Zytoplasma ist für eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der elektrischen Erregung von Muskel- und Nervenzellen, der Hormonsekretion, der Zellteilung und der sensorischen Wahrnehmung wichtig. Es spielt außerdem eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Wasser- und Salzhaushaltes, des Blutdrucks, sowie des Kreislaufs. Entsprechend dieser großen physiologischen Bedeutung hat sich eine Vielzahl von Transportproteinen entwickelt, die auf den Austausch von Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Chloridionen spezialisiert sind, und die aufgrund ihrer Struktur und Funktion in Kanäle, Transporter und Pumpen untergliedert werden.

### 1.1 Ionenkanäle, Transporter und Pumpen

Ionenkanäle, Transporter und Pumpen sind transmembranäre Proteinkomplexe, die die Zellmembran durchspannen, und wie diese auch amphiphile Eigenschaften aufweisen. Dort, wo sie mit den Fettsäuren im Inneren der Lipiddoppelschicht in Kontakt stehen, weisen sie lipophile Eigenschaften auf, während die Anteile, die in das Zytoplasma und in den extrazellulären Raum ragen,

oder die mit den transportierten Ionen wechselwirken, hydrophile Eigenschaften besitzen. Ein bestimmtes Transportprotein ist jeweils auf den Transport einer ganz bestimmten Substanz oder einer Substanzgruppe spezialisiert. Die Aktivität der Transportproteine kann auf vielfältige Weise reguliert werden. Sie kann einerseits durch die Veränderung der Anzahl der Proteine in der Membran erfolgen, z.B. durch eine verstärkte Biosynthese oder durch vermehrten Einbau in die Membran. Andererseits können die Proteine in der Membran durch biochemische Modifizierung, wie zum Beispiel durch Phosphorylierung und Glykosylierung, oder durch die Bindung von Liganden in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

Neben diesen Gemeinsamkeiten existieren bei Ionenkanälen, Transportern und Pumpen einige generelle Unterschiede. Ionenkanäle können in einer geöffneten oder einer geschlossenen Konformation vorliegen. Der Wechsel vom einen zum anderen Zustand wird als Schalten oder als *Gating* bezeichnet. In der geöffneten Konformation bilden Ionenkanäle eine mit Wasser gefüllte Pore durch die Membran, die von bis zu 100 Millionen Ionen pro Sekunde passiert werden kann. Dies geschieht, abgesehen von kleinen dynamischen Bewegungen der porenbildenden Aminosäurereste, ohne weitere Konformationsänderungen des Kanalproteins. Ionenkanäle erlauben die passive Diffusion von Teilchen, wobei die Richtung des Transports und die treibende Kraft vom elektrochemischen Gradienten des jeweiligen Ions bestimmt werden. In der geschlossenen Konformation ist die Pore blockiert und der Ionenfluß verhindert.

Der Fluß von Ionen durch einen geöffneten Kanal ist aber nicht nur vom elektrochemischen Gradienten abhängig. Er wird auch von der Permeabilität des Kanals für das jeweilige Ion bestimmt. Mit Hilfe des Selektivfilters, der sich an der engsten Stelle der Pore befindet, werden Ionen aufgrund von Größe und Ladung unterschieden. Die Aminosäuren in dieser Region bestimmen welche Ionen den Kanal passieren können und welche nicht. Entsprechend dieser Selektivität können Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Chlorid-Kanäle unterschieden werden. Bei einigen Kanälen ist die Permeabilität für Ionen in beiden Richtungen unterschiedlich stark ausgeprägt, was auch als Rektifizierung bezeichnet wird.

Transporter und Pumpen binden im Gegensatz zu den Ionenkanälen die zu transportierenden Moleküle und durchlaufen einen Transportzyklus, der ihre Konformationsänderungen mit dem Membrantransport verknüpft. Sie können aufgrund ihrer Funktionsweise mit Enzymen verglichen werden, die einen vektoriellen Transport katalysieren und zeigen für das transportierte Molekül eine Spezifität, eine bestimmte Affinität und eine maximale Transportkapazität. Viele Transporter arbeiten mit Flußkopplung, wodurch ein unfreiwillig verlaufender Transportprozeß durch Kopplung an einen anderen, freiwillig verlaufenden Transportprozeß ermöglicht wird. Der Transport der beteiligten Moleküle erfolgt hierbei in einer bestimmten Kombination und fester Stöchiometrie. Hinsichtlich der Transportrichtung unterscheidet man dabei Symport und Antiport. Der Symport vermittelt den Transport von zwei oder mehr Substraten in dieselbe Richtung. Dabei kann es sich, wie beim Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter, ausschließlich um Ionen handeln, oder wie bei anderen Transportern

beispielsweise um ein Gemisch aus Protonen und Peptiden. Beim Antiport erfolgt der Transport eines Substrates im Austausch gegen ein anderes, wobei die Translokation nur stattfindet, wenn beide Substrate gebunden sind. Ein Beispiel dafür ist der Natrium-Kalzium-Austauscher NCX. Die Bewegung eines einzelnen Substratmoleküls wird als Uniport bezeichnet. Uniporter vermitteln zum Beispiel die zelluläre Aufnahme von Glukose und Aminosäuren.

Die von Ionenkanälen und Transportern vermittelten, sogenannten sekundär-aktiven Transportvorgänge werden von bestehenden Konzentrations- und Ladungsgradienten angetrieben, die zuvor durch energieverbrauchende, primär-aktive Prozesse aufgebaut wurden. Der primär-aktive Transport erfolgt unter Einsatz von chemischer Energie und wird durch Pumpen vermittelt. Diese hydrolysieren Adenosintriphosphat (ATP) und nutzen die dabei freiwerdende Energie für den Transport von Substraten gegen einen elektrochemischen Gradienten. Als wichtigster primär-aktiver Transportprozeß sorgt die Natrium-Kalium-ATPase durch Antiport intrazellulär für eine niedrige Natrium- und eine hohe Kaliumkonzentration und ist damit für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials wichtig. Transporter und Pumpen haben somit als weitere Abgrenzung zu Ionenkanälen die Fähigkeit, Substrate auf einer Seite der Membran zu konzentrieren, indem sie entweder selbst ATP hydrolysieren oder Transportprozesse durch Symport oder Antiport kombinieren und so die Energie ausnutzen, die durch den elektrochemischen Gradienten eines anderen Substrates zur Verfügung gestellt wird (Bröer & Wagner, 2003).

Ionenkanäle werden nicht nur aufgrund ihrer Ionenselektivität, sondern auch hinsichtlich ihres Aktivierungsmechanismus unterschieden. Eine Gruppe von Kanälen wird durch Änderungen des Membranpotentials geöffnet. Diese spannungsgesteuerten Ionenkanäle reagieren auf die Depolarisation der Zellmembran und spielen eine zentrale Rolle bei der Erregung von Muskel- und Nervenzellen. Auf die spannungsgesteuerte Aktivierung folgt bei einigen dieser Kanäle eine weitere Konformationsänderung in den inaktiven Zustand, in dem keine Ionen den Kanal passieren können. Erst nach einer gewissen Erholungsphase und Rückkehr in den geschlossenen Zustand kann der Kanal erneut aktiviert werden (Catterall, 1995).

Mechanosensitive Kanäle reagieren auf Druckänderungen, die entweder direkt über den Kontakt mit den Lipiden der Zellmembran oder indirekt über das Zytoskelett auf den Kanal übertragen werden (Kung, 2005). Dieser Kanaltyp ist physiologisch von großer Bedeutung, da er beim Tast- und Gehörsinn sowie bei der Zellvolumen- und Osmoregulation eine wichtige Rolle spielt (Hamill & Martinac, 2001).

Die dritte Klasse bilden die ligandengesteuerten Ionenkanäle. Die Aktivierung des Kanals durch das Ligandenmolekül kann hierbei direkt oder indirekt erfolgen. Bei der ersten Gruppe binden Hormone wie Serotonin oder Neurotransmitter wie Acetylcholin und Glycin an spezifische, extrazelluläre Bindestellen des Kanals und lösen dadurch eine Konformationsänderung aus, die zum Öffnen der Pore führt. Bei der zweiten Gruppe führt die Bindung eines Signalmoleküls an einen



Zelloberflächenrezeptor zur Aktivierung eines G-Proteins auf der Membrannenseite, das dann entweder durch direkte Bindung an den Kanal diesen öffnet, oder indirekt über die Bereitstellung sekundärer Botenstoffe, wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Phosphoinositole und Kalziumionen, die Öffnung des Kanals bewirkt. Ligandengesteuerte Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der synaptischen Übertragung der Erregung im Nervensystem (Barry & Lynch, 2005).

Eine weitere Gruppe von Ionenkanälen ist durch das Fehlen eines speziellen Aktivierungsmechanismus gekennzeichnet. Sie sind z.B. über einen weiten Bereich des Membranpotentials geöffnet und stellen damit eine Art Hintergrundleitfähigkeit dar. Diese Kanäle beeinflussen die Erregbarkeit von Zellen und spielen auch eine Rolle beim Ionentransport über Epithelien.

Das *Gating* nahezu aller Ionenkanäle kann darüber hinaus durch eine Vielzahl anderer Faktoren und Substanzen moduliert werden. Von großer Bedeutung sind hierbei intrazelluläre Kalziumionen, Adenosintriphosphat (ATP), Lipide, der intrazelluläre pH-Wert oder der Redoxzustand der Zelle. Außerdem regulieren Effektoren verschiedenster Signalkaskaden, wie Kinasen und Phosphatasen, die Aktivität von Ionenkanälen in Abhängigkeit unterschiedlicher physiologischer Anforderungen.

Das funktionelle Zusammenwirken von Ionenkanälen, Transportern und Pumpen erzeugt bei allen Zellen aufgrund unterschiedlicher Ionenverteilungen eine Potentialdifferenz zwischen Zellinnerem und Zelläußeren, die als Membranpotential bezeichnet wird. Beim Membranpotential handelt es sich um ein Diffusionspotential für die durch Ionenkanäle permeablen Ionen. Da die Zellmembran im Grundzustand vorwiegend für Kaliumionen leitend ist, ist das Ruhemembranpotential in erster Näherung ein Kaliumgleichgewichtspotential. Die Abweichung vom berechneten Kaliumgleichgewichtspotential von -90 mV ist durch eine geringfügige Natrium- und Chloridleitfähigkeit bedingt. Für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials ist insbesondere der primär-aktive Transport der Natrium-Kalium-ATPase verantwortlich.

Bei Nerven- und Muskelzellen bildet das Membranpotential die Grundlage für deren Erregbarkeit. Wenn vom Ruhemembranpotential ausgehend die Membran schnell depolarisiert wird, setzt beim Überschreiten des Schwellenpotentials die Erregung ein und ein Aktionspotential wird ausgelöst.

Bei nicht erregbaren Epithelzellen trägt das Membranpotential zu einer transepithelialen Spannungsdifferenz zwischen dem apikalen Lumen und der basolateralen Blutseite bei, was eine Voraussetzung für die Sekretion und Resorption von Salzen ist.

## 1.2 Kaliumkanäle

Die Kaliumkanäle stellen mit rund 80 Vertretern die größte Familie unter den Ionenkanälen dar. Dementsprechend wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Kaliumleitfähigkeiten in nahezu allen bisher untersuchten Zellen und Organismen beschrieben. Alle Kaliumkanäle zeichnen sich durch eine hohe Selektivität für Kaliumionen aus. Diese Selektivität wird durch ein Tripeptid-Sequenzmotiv aus GYG, GFG oder GIG vermittelt, welches in der Porenregion der Kanalproteine lokalisiert ist.

Kaliumkanäle werden aufgrund der Topologie der porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheit in drei Gruppen gegliedert, die sich in der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TMD) und Porenschleifen (P) unterscheiden (Biggin *et al.*, 2000; Choe, 2002).

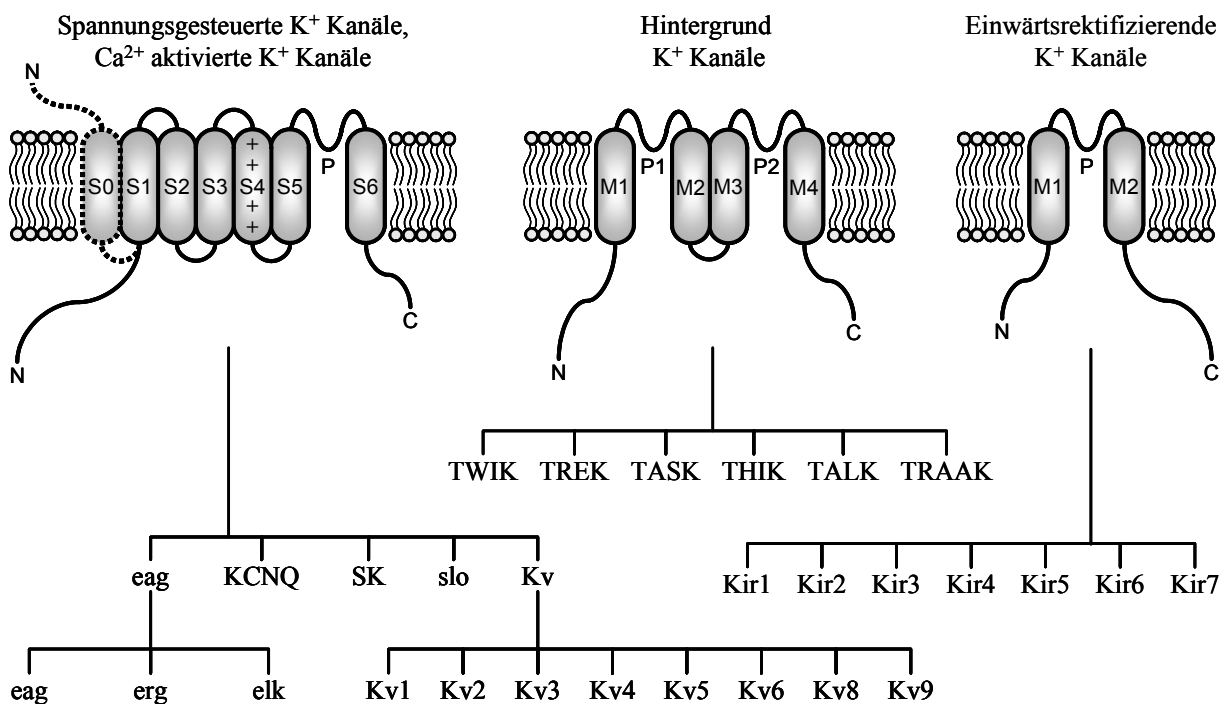


Abbildung 1: Schematische Darstellung der porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten der Kaliumkanäle. Sie werden aufgrund ihrer Membrantopologie in drei Gruppen gegliedert, die wiederum aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in Familien und weiter in Unterfamilien unterteilt werden.

Die erste Gruppe verfügt über sechs TMD (S1-S6) und eine Porendomäne zwischen S5 und S6 (6TMD-1P). Die S4-Domäne besitzt mehrere positiv geladene Aminosäuren und dient als Spannungssensor. Die N- und C-Termini befinden sich intrazellulär. Zu dieser funktionell sehr heterogenen Gruppe gehören die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle der Shaker- (*Kv1*), Shab- (*Kv2*, *Kv8*), Shaw- (*Kv3*) und Shal- (*Kv4*) Familien, die spannungsgesteuerten *Delayed Rectifier* Kanäle vom *Eag*-Typ (*Kv10*-*Kv12*) und der *KCNQ*-Familie (*Kv7*), sowie die kalziumaktivierten *Small Conductance* (*SK*,  $K_{Ca1}$ - $K_{Ca3}$ ), *Intermediate Conductance* ( $K_{Ca4}$ ) und *Big Conductance* Kanäle (*Slo*,  $K_{Ca5}$ ). Die *SK*-Kanäle besitzen keinen S4-Spannungssensor und werden deshalb nicht durch Änderungen des Membranpotentials reguliert. Die *Slo*-Kanäle haben im Unterschied zu allen anderen

Mitgliedern dieser Gruppe eine zusätzliche siebte TMD (S0) und einen extrazellulär gelegenen Aminoterminus. Der erste Kaliumkanal überhaupt wurde aus der *Shaker*-Mutante von *Drosophila melanogaster* kloniert, die unter dem Einfluß von Äther ein Zittern (*Shaking*) der Beine zeigte (Papazian *et al.*, 1987). Das entsprechende Säugerhomolog Kv1.1 wurde kurz darauf aus dem Gehirn der Maus kloniert und begründete damit die Familie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle aus Säugern (Tempel *et al.*, 1988). Inzwischen wurde mit Kv1.2 auch die erste Kristallstruktur eines *Shaker*-Kanals aufgeklärt (Long *et al.*, 2005).

Die zweite Gruppe besitzt vier TMD und als strukturelle Besonderheit zwei Porendomänen (4TMD-2P oder K<sub>2P</sub>) (Lesage *et al.*, 1996a). Bisher wurden sechs K<sub>2P</sub>-Unterfamilien beschrieben: TWIK (*Twin pore Weak Inward rectifying K<sup>+</sup> channel*), TREK (*Two pore outward REctifying K<sup>+</sup> channel*), TASK (*TWIK related Acid Sensitive K<sup>+</sup> channel*), THIK (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channel*), TRAAK (*TWIK Related Arachidonic Acid stimulated K<sup>+</sup> channel*) und TALK (*TWIK related ALkaline pH activated K<sup>+</sup> channel*). Die Kanäle dieser Gruppe sind im physiologischen Spannungsbereich geöffnet und ihre Ströme zeigen kein Gating, weshalb man sie auch als Hintergrundleitfähigkeiten bezeichnet. Ihre Aktivität kann aber durch verschiedene physikalische und chemische Reize, wie Temperatur, Zellvolumen, mechanischer Streß, zytoplasmatischer und extrazellulärer pH-Wert, sowie Lipide reguliert werden (Goldstein *et al.*, 2001; Lesage & Lazdunski, 2000). Damit spielen diese Kanäle vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Membranpotentials und vermitteln die Thermo-, Chemo- und Mechanosensitivität vieler Neuronen. Die K<sub>2P</sub>-Kanäle besitzen eine besondere Pharmakologie. Sie werden nicht durch die typischen Kaliumkanalblocker gehemmt, sind aber empfindlich gegenüber verschiedenen Anästhetika.

Die dritte Gruppe der Kaliumkanäle besitzt zwei TMD (M1 und M2) und eine Porenschleife (2TMD-1P), die zu der der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle homolog ist (Ho *et al.*, 1993), sowie intrazelluläre Termini, die eine ganze Reihe von regulatorischen Domänen enthalten (Hebert *et al.*, 2005; Wang, 2006). Sie bilden die Gruppe der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (Kir) mit sieben Unterfamilien. Als erster Vertreter dieser Gruppe wurde ROMK (Kir1.1) aus der Niere der Ratte charakterisiert (Bleich *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 1993). Die einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle werden in einem späteren Abschnitt ausführlich beschrieben.

Ein typischer Kaliumkanal setzt sich aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten zusammen, die eine gemeinsame, zentrale Pore ausbilden. Die Tetramere können hierbei aus identischen Untereinheiten bestehen oder sich aus verschiedenen, aber sehr ähnlichen Untereinheiten zusammensetzen. Einige Kaliumkanaluntereinheiten, wie Kv5.1, Kv6.x, Kv9.x sowie Kir5.1, sind nicht in der Lage, alleine einen funktionellen Kanal zu bilden und lagern sich deshalb mit verwandten Untereinheiten zu heterotetrameren Kanalkomplexen mit neuartigen Eigenschaften zusammen. Sie stellen deshalb in gewisser Weise modulatorische Untereinheiten dar (Biggin *et al.*, 2000; Choe, 2002). Die K<sub>2P</sub>-Kanäle bilden abweichend von den anderen Kaliumkanälen Dimere aus. Da ihre Grundstruktur aber der von

zwei kovalent verknüpften 2TMD-1P-Untereinheiten entspricht, verfügen auch diese Kanäle über eine Vierfachsymmetrie mit einer zentral gelegenen Pore (Lesage *et al.*, 1996a, 1996b).

### 1.3 Regulatorische Kanaluntereinheiten

Die porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten der Kaliumkanäle interagieren mit einer Vielzahl von akzessorischen Proteinen. Dadurch wird neben den biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der Kanäle auch deren physiologische Regulation beeinflusst. Andere Interaktionspartner wiederum können auch die Expressionsdichte der Kanalproteine modulieren, indem sie beispielsweise deren *Trafficking* zur Plasmamembran hin oder von der Zelloberfläche in intrazelluläre Kompartimente beeinflussen. Je nach ihrer Wirkung auf die Kanalproteine werden diese regulatorischen Proteine auch als  $\beta$ -Untereinheiten oder Chaperone bezeichnet.

Die zytoplasmatischen  $\beta$ -Untereinheiten der spannungsgesteuerten Kv-Kanäle modifizieren die Kinetik der Inaktivierung (Pongs *et al.*, 1999). Sie sind zudem verwandt mit NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen und übertragen dadurch eine Redoxsensitivität auf den heteromeren Kv-Kanalkomplex (Bähring *et al.*, 2001).

Die löslichen KChIP-Proteine (*Kv Channel Interacting Protein*) interagieren selektiv mit den schnell inaktivierenden Kanälen der Kv4-Familie und bewirken dadurch nicht nur kinetische Veränderungen der Kaliumströme, sondern erhöhen gleichzeitig auch deren Expressionsniveau (An *et al.*, 2000; Decher *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004). Die nach Koexpression mit KChIP2 resultierenden elektrophysiologischen Eigenschaften des heteromeren Kv4.3-Kanals sind dem transienten Auswärtsstrom ( $I_{to}$ ) des menschlichen Herzens viel ähnlicher als die des homomeren Kanals (Decher *et al.*, 2001). KChIP3 übt zudem eine Funktion als kalziumabhängiger Transkriptionsfaktor aus (Carrion *et al.*, 1999), was zeigt, daß Ionenkanal-Untereinheiten vielfältige Funktionen ausüben können. Die Kv4-Kanäle interagieren auch mit dem Membranprotein DPPX (*Dipeptidyl Aminopeptidase-like protein*), welches die Inaktivierung des Kv4.2-Kanals beschleunigt. Auch hier zeigt der resultierende Strom eine größere Ähnlichkeit zum nativen Strom in Nervenzellen (Nadal *et al.*, 2003).

Das zytoplasmatische KChAP (*K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*) erhöht nach Koexpression die Zelloberflächenexpression und damit die Stromdichte verschiedener Kv-Kanäle, wie Kv1.3, Kv2.1 und Kv4.3 (Wible *et al.*, 1998; Kuryshv *et al.*, 2000; Abriel *et al.*, 2000). KChAP wurde mittlerweile als SUMO-Ligase identifiziert, die die kovalente Modifizierung von Proteinen mit kleinen ubiquitin-ähnlichen Strukturen katalysiert, wodurch deren Expression an der Plasmamembran erhöht wird (Jackson, 2001).

Das MinK-Protein (*Minimal K<sup>+</sup> channel Protein*; *IsK*, *KCNE1*) ist ein integrales Membranprotein mit einer Transmembrandomäne (Takumi *et al.*, 1988), welche gleich mehrere biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften des KCNQ1-Kanals verändert. Die

Koexpression verlangsamt die Aktivierung der KCNQ1-Ströme, erhöht deren Amplitude, hebt die Inaktivierung der Kaliumströme auf und erhöht die Leitfähigkeit des Kanals (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Sesti & Goldstein, 1998; Bianchi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Tapper & George, 2000). MinK erhöht außerdem die Sensitivität des Kanals gegenüber dem Blocker Chromanol 293B (Lerche *et al.*, 2000) und vermittelt auch die cAMP-abhängige Aktivierung des  $I_{Ks}$ -Stroms im menschlichen Herzen (Cui *et al.*, 2000).

Die integralen Membranproteine Sloß haben zwei Transmembrandomänen und sind regulatorische  $\beta$ -Untereinheiten des MaxiK-Kanalkomplexes (*Big conductance  $K^+$  channel*, BK). Die beobachtete Diversität der MaxiK-Ströme geht auf die gewebsspezifische Assoziation mit einer der vier verschiedenen Sloß-Untereinheiten zurück. Diese  $\beta$ -Untereinheiten können die Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Inaktivierungskinetiken, sowie die Sensitivität gegenüber Kalzium und pharmakologischen Wirkstoffen in unterschiedlicher, oft auch entgegengesetzter Weise, verändern (Cox *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 1999, 2000; Brenner *et al.*, 2000, 2005; Meera *et al.*, 2000).

Das lösliche, kalziumbindende Protein Calmodulin vermittelt die kalziumabhängige Regulation einer Vielzahl von Ionenkanälen und Transportern, wie der kalziumaktivierten SK-Kanäle (Xia *et al.*, 1998) oder dem ligandengesteuerten Ryanodinrezeptor RYR2, der für die Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist und damit eine wichtige Funktion bei der Kontraktion des Herzmuskels spielt (Hamilton *et al.*, 2000)

Die Sulfonylharnstoffrezeptorproteine (SUR) besitzen 12 Transmembrandomänen und bilden mit dem Kir6.2-Kanalprotein den klassischen ATP-regulierten  $K_{ATP}$ -Kanal. Die SUR-Untereinheiten vermitteln hierbei neben der typischen Pharmakologie auch die ATP-Sensitivität der heteromeren Kanalproteinkomplexe. Die in verschiedenen Geweben, wie den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, Kardiomyozyten und der Gefäßmuskulatur beobachteten unterschiedlichen Eigenschaften der  $K_{ATP}$ -Kanäle werden durch unterschiedliche SUR-Untereinheiten hervorgerufen (Inagaki *et al.*, 1995; Ammälä *et al.*, 1996).

Außer mit regulatorischen Kanaluntereinheiten interagieren Ionenkanäle auch mit Proteinen, die für die richtige subzelluläre Lokalisierung der Kanalproteinkomplexe sorgen. Eine Gruppe, die hier an bevorzugter Stelle erwähnt werden muß, sind die MAGUK-Proteine (*Membrane Associated GUanylate Kinases*), die eine Vielzahl unterschiedlicher Kaliumkanäle wie Kv1.5, Kir4.1 und die Kir2-Familie an bestimmten Membrandomänen von Zellen verankern (Godreau *et al.*, 2002; Horio *et al.*, 1997; Leonoudakis *et al.*, 2004). Für die Bindung an Kanalproteine verfügen die MAGUKs über mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie PDZ und SH3 und spielen damit eine Schlüsselrolle bei der Organisation und subzellulären Lokalisation von Multiproteinkomplexen. Obwohl die genauen Mechanismen ihrer Funktionen noch nicht ganz aufgeklärt sind, wird von ihnen die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran reguliert und die Signaltransduktion zwischen Ionenkanälen und Enzymen sowie G-Protein-abhängigen Signalwegen vermittelt. Zu der Familie der MAGUKs zählen unter anderem

PSD-95 (*Post Synaptic Density 95*), sowie SAP97 und SAP102 (*Synapse Associated Protein 97* und *102*) (Fujita & Kurachi, 2000).

#### 1.4 Einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle und ihre physiologische Bedeutung

Die einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle ( $K^+$  *inward rectifier*, Kir) bilden eine Gruppe mit 15 Mitgliedern, die sich auf sieben Unterfamilien aufteilen. Diese Kanäle sind dadurch charakterisiert, daß sie Kaliumionen vorwiegend in die Zelle hinein passieren lassen (Lu, 2004b). Diese Eigenschaft, die als Einwärtsrektifizierung oder Einwärtsgleichrichtung bezeichnet wird, ist aber keine intrinsische Eigenschaft des Kanalproteins, sondern wird durch eine spannungsabhängige Blockade des Kanals durch intrazelluläre Kationen hervorgerufen. Bei Membranspannungen, die positiv zum Kaliumgleichgewichtspotential liegen, binden positiv geladene Magnesiumionen und Polyamine an negativ geladene Aminosäuren in der Porenregion und am C-Terminus des Kanalproteins (Lopatin *et al.*, 1994; Ficker *et al.*, 1994; Tagliatela *et al.*, 1995; Fujiwara *et al.*, 2002). Polyamine, die in der Porenregion gebunden haben, bilden hierbei eine Art Pfropfen, der die Kanalpore blockiert, und somit den Ausfluß von Kaliumionen aus der Zelle verhindert (Lopatin *et al.*, 1995). Dieser Block des Kanals wird durch Hyperpolarisierung der Membran aufgehoben, so daß Kaliumionen in die Zelle einströmen.

Die Stärke der beobachteten Einwärtsgleichrichtung ist dabei variabel und wird durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten dieser zellulären Blocker für das jeweilige Kanalprotein hervorgerufen. Eine hohe Affinität wie bei Kir2.1 (IRK1) führt deshalb zu einer starken und eine geringe Affinität wie bei Kir1.1 (ROMK) zu einer schwachen Einwärtsrektifizierung. Schwach einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle wie ROMK können aus diesem Grund auch eine Rolle bei der physiologischen Kaliumsekretion spielen.

Die Topologie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle entspricht der S5-P-S6 Anordnung der spannungsgesteuerten 6TDM-1P-Kaliumkanäle und wurde erstmalig anhand der Kristallstruktur des KcsA-Kaliumkanals aus *Streptomyces lividans* aufgeklärt (Doyle *et al.*, 1998). Kir-Kanäle besitzen aber im Unterschied zu KcsA sehr große C-terminale Bereiche. Die dreidimensionale Struktur der zytoplasmatischen Regionen dieser Kanäle wurde durch Kristallisierung des bakteriellen KirBac1.1 (Kuo *et al.*, 2003), sowie entsprechender Proteinfragmente des Säugerproteins Kir3.1 (Nishida *et al.*, 2002) aufgeklärt.

Die einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle verrichten sehr unterschiedliche physiologische Aufgaben. So werden die starken Einwärtsrektifizierer Kir2.1-2.4 unter anderem in erregbaren Zellen exprimiert. Sie sind nur bei sehr negativen Membranpotentialen geöffnet und stabilisieren dadurch das Ruhemembranpotential von Neuronen, sowie von Herz- und Skelettmuskelzellen. Damit bestimmen sie maßgeblich die Schwelle für das Auslösen eines Aktionspotentials. Der Kir2.3-Kanal soll auch in der basolateralen Membran des distalen Nephrons vorkommen und dort an der Aufrechterhaltung des

negativen Membranpotentials beteiligt sein, was für die Ausbildung der transepithelialen Spannungsdifferenz und damit für die Salzresorption wichtig ist (Welling, 1997).

Die durch G-Proteine regulierten Einwärtsrektifizierer Kir3.1-3.4 verknüpfen die Aktivierung von ligandengesteuerten und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit einer elektrischen Aktivierung und vermitteln damit den Effekt von Hormonen und Neurotransmittern auf die elektrische Erregbarkeit von Neuronen und Herzmuskelzellen.

Die Kir5.1-Untereinheit bildet alleine keine funktionellen Kanäle (Bond *et al.*, 1994; Tanemoto *et al.*, 2000a), sondern formt Heteromere mit Kir4.1 und Kir4.2, die im Gehirn und in der Niere exprimiert werden (Shuck *et al.*, 1997; Tanemoto *et al.*, 2000a; Lourdel *et al.*, 2002; Konstas *et al.*, 2003). Diese Kanäle besitzen andere Eigenschaften als die homomeren Kv4-Kanäle und stellen sehr wahrscheinlich die molekulare Grundlage der kleinen Kaliumleitfähigkeit der basolateralen Membran des distalen Nephrons dar. Diese ist für das Recycling der Kaliumionen verantwortlich, die über die Natrium-Kalium-ATPase in die Zelle gelangen, und ermöglicht somit die Resorption von Natriumionen (Lourdel *et al.*, 2002).

Kir6.1 und Kir6.2 sind die porenbildenden Untereinheiten des ATP-sensitiven Kaliumkanals  $K_{ATP}$ . Die Aktivität von  $K_{ATP}$  wird durch zytosolisches ATP gehemmt und verknüpft damit den Zellmetabolismus mit der elektrischen Erregbarkeit der Zellmembran. Der  $K_{ATP}$ -Kanal ist wichtig für die Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, schützt durch seine Aktivierung Herzmuskel- und Nervenzellen während einer Ischämie vor einer Übererregbarkeit der Zellmembran und kontrolliert auch die Erregbarkeit der glatten Gefäßmuskulatur.

Kir7.1, der erstmals aus humanem Gehirn kloniert und später auch in der basolateralen Membran des Nephrons nachgewiesen wurde, zeigt eine ungewöhnlich kleine Leitfähigkeit von nur 50 fS und eine geringe Sensitivität gegenüber den Standardblockern der Kaliumkanälen. Als weitere Besonderheiten ist der Kir7.1-Strom von der extrazellulären Kaliumkonzentration weitgehend unabhängig und die Rektifizierung wird nicht durch intrazelluläre Magnesiumionen beeinflusst (Doring *et al.*, 1998; Krapivinsky *et al.*, 1998; Partiseti *et al.*, 1998). Die Lokalisation nahe der Natrium-Kalium-ATPase spricht ebenfalls für eine Beteiligung beim Kaliumrecycling (Nakamura *et al.*, 1999; Ookata *et al.*, 2000).

## 1.5 ROMK: Molekularbiologie, Struktur und Funktion

ROMK (*Renal Outer Medulla K<sup>+</sup> channel*, Kir1.1) wurde erstmals in der apikalen Membran isolierter Segmente des dicken aufsteigenden Astes der Henle'schen Schleife (TAL) mit Hilfe von *Patch-Clamp* Experimenten elektrophysiologisch charakterisiert (Bleich *et al.*, 1990). Die nachfolgende Klonierung aus der Niere von Ratte und Mensch (Ho *et al.*, 1993; Shuck *et al.*, 1994) begründete die Gruppe der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle. Das menschliche *KCNJI*-Gen kodiert für mehrere RNS-Transkripte, die für drei Proteinisoformen kodieren, welche sich nur in ihrer

aminoterminalen Aminosäuresequenz unterscheiden. ROMK2 (Kir1.1b) hat mit 372 Aminosäuren die kürzeste Sequenz. ROMK1 (Kir1.1a) und ROMK3 (Kir1.1c) sind um 19 bzw. 26 Aminosäuren länger (Boim *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1996; Bock *et al.*, 1997) und enthalten zusätzliche Phosphorylierungsstellen (Macica *et al.*, 1996, 1997). Ihre biophysikalischen Eigenschaften sind aber identisch. Die physiologische Bedeutung der drei verschiedenen ROMK-Isoformen ist bisher ungeklärt. Sie scheinen sich aber in ihrer Verteilung entlang des Nephrons zu unterscheiden.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, daß das ROMK-Protein in den apikalen Membranen des Nephrons lokalisiert ist. Mithilfe von *in situ* Hybridisierungen wurden die Transkripte für ROMK2 und ROMK3 vorwiegend im TAL und im distalen Konvolut (DC) nachgewiesen, während ROMK1 und auch ROMK2 im kortikalen Sammelrohr (CCD) gefunden wurden (Mennitt *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Kohda *et al.*, 1998). Ob die verschiedenen Isoformen untereinander auch Heterotetramere ausbilden können, konnte bislang nicht gezeigt werden. Aufgrund der überlappenden Verteilung wäre im TAL das Vorkommen eines Heteromers aus ROMK2 und ROMK3 und im CCD eines aus ROMK1 und ROMK2 möglich.

Die dreidimensionale Membranstruktur des ROMK-Kanals selbst ist noch nicht aufgeklärt, sie kann jedoch aus den vorliegenden Röntgenstrukturen der bakteriellen KcsA- (Doyle *et al.*, 1998) und KirBac1.1-Kaliumkanäle (Kuo *et al.*, 2003) abgeleitet werden. Für die Beschreibung der zytosolischen Bereiche können weiterhin entsprechende Strukturinformationen der Säugerkanäle Kir2.1 und Kir3.1 (Nishida & MacKinnon, 2002; Pegan *et al.*, 2005) herangezogen werden. Demnach ergibt sich folgende Gliederung des Kanalproteins: Der extrazellulären Membranseite zugewandt befindet sich der Kaliumselektivitätsfilter mit der GYG-Signatursequenz. Die Kanalpore ist in die Membran eingebettet und am Übergang von der Plasmamembran zum Zytoplasma liegt das Kanal-*Gate*, an das sich über flexible Verbindungsstücke die zytoplasmatische „Porenregion“ anschließt, die von  $\beta$ -Faltblattstrukturen des C-Terminus gebildet wird (Kuo *et al.*, 2003).

Der ROMK-Kanal soll für die Bildung von zwei ATP-sensitiven Kaliumkanälen in der Niere verantwortlich sein, die eine 35 pS und eine 70 pS große Leitfähigkeit besitzen. Dementsprechend konnten in Patch-Clamp-Analysen von ROMK-Knock-Out-Mäusen keine der beiden Leitfähigkeiten nachgewiesen werden. Es gibt zudem Hinweise dafür, daß bei einer niedrigen Kaliumaufnahme bevorzugt der Kanal mit der 35 pS-Leitfähigkeit und bei einer hohen Kaliumaufnahme vorzugsweise der 70 pS-Kanal gebildet wird, und es wird vermutet, daß für die Ausbildung dieser unterschiedlichen Eigenschaften bisher noch unbekannte Kanaluntereinheiten verantwortlich sind (Lu *et al.*, 1996, 2002, 2004a).

Trotz der einwärtsrektifizierenden Eigenschaft der ROMK-Ströme beruht die physiologische Funktion von ROMK auf der Kaliumsekretion. Die schwache Rektifizierung der Kaliumströme erlaubt in Verbindung mit einer hohen Offenwahrscheinlichkeit des Kanals signifikante Kaliumauswärts-



ströme bei physiologischen Membranpotentialen. Diese spielen eine wichtige Rolle beim Kaliumrecycling im TAL sowie bei der Kaliumexkretion im CCD (Hebert *et al.*, 2005) (Abb. 2).

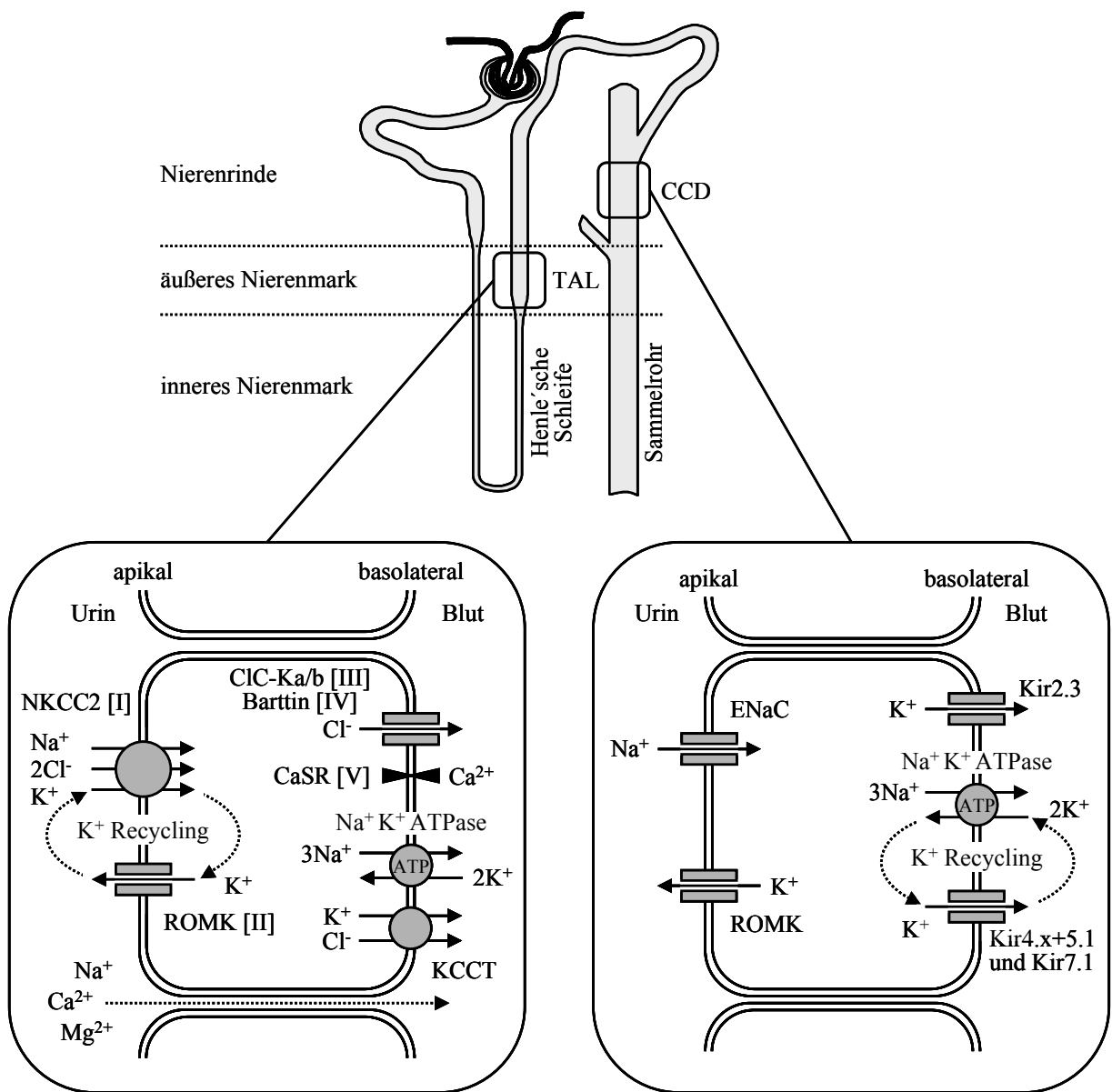


Abbildung 2: Schematische Darstellung des trans- und parazellulären Ionentransports im dicken aufsteigenden Ast der Henle'sche Schleife (TAL, linke Box) und im kortikalen Sammelrohr (CCD, rechte Box) des Nephrons. Funktionsverluste folgender Proteine wurden als molekulare Grundlagen des Bartter-Syndroms identifiziert: NKCC2 (Typ I, Simon *et al.*, 1998), ROMK (Typ II, Simon *et al.*, 1996), ClC-Kb (Typ III, Simon *et al.*, 1997), Barttin (Typ IV, Estevez *et al.*, 2001; Birkenhäger *et al.*, 2001), CaSR (Typ V, Vargas-Poussou *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002). Barttin: ClC-K β-subunit; CaSR: Ca<sup>2+</sup> receptor; ClC-Ka/b: renal Cl<sup>-</sup> channel Ka and Kb; ENaC: epithelial Na<sup>+</sup> channel; KCCT: K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> cotransporter; Kir: K<sup>+</sup> inward rectifier; NKCC2: Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> 2Cl<sup>-</sup> cotransporter type 2; ROMK: renal outer medullary K<sup>+</sup> channel.

Das Kaliumrecycling über die apikale Membran des TAL ist die Voraussetzung für die Resorption von Natriumchlorid, die hauptsächlich durch den apikalen Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter (NKCC2) erfolgt, und der für seine Funktion ein kontinuierliches Angebot an luminalem Kalium benötigt. (Greger, 1985; Bleich *et al.*, 1990). Der Kaliumausstrom bewirkt zudem

die Aufrechterhaltung eines negativen Potentials auf der Membraninnenseite, das apikal den Einstrom von Natrium und basolateral den Ausstrom von Chlorid antreibt. Als Konsequenz daraus entsteht über das Epithel eine Potentialdifferenz, die die parazelluläre Resorption von Kalziumionen antreibt (Abb. 2).

Im CCD stellt ROMK den Hauptweg für die Sekretion bzw. Exkretion der basolateral über die Natrium-Kalium-ATPase aufgenommenen Kaliumionen dar und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kaliumgleichgewichts im Körper. Die apikale Kaliumsekretion im CCD ist wiederum Voraussetzung für die ebenfalls apikale Resorption von Natriumionen über den epithelialen Natriumkanal ENaC (Giebisch, 1998) (Abb. 2).

Die Bedeutung von ROMK für die renale Kochsalzresorption und Wasserretention wird durch Mutationen im menschlichen *KCNJ1*-Gen verdeutlicht, die bei einem Funktionsverlust des Kanalproteins die vorgeburtliche Form des Bartter-Syndroms vom Typ II verursachen. Pränatal zeigt sich das klinische Bild in einer übermäßigen Volumenzunahme des Fruchtwassers, was zu einer Frühgeburt führen kann. Postnatal kommt es zu starkem Salz- und Wasserverlust in Verbindung mit einem erniedrigten Blutdruck. Weitere klinische Symptome sind Hypokaliämie, metabolische Alkalose, sowie Hyperkalziurie, die zu einer Nierenverkalkung und letztlich zu einer Niereninsuffizienz führen kann. Zusätzlich sind die Spiegel der Nierenhormone Renin und Aldosteron erhöht (Bartter *et al.*, 1962; Karolyi *et al.*, 1997; Jeck *et al.*, 2001; Starremans *et al.*, 2002). Dieselben Symptome werden auch in ROMK-Knockout-Mäusen, beobachtet (Lorenz *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002).

## 1.6 Regulation von ROMK

Die Aktivität von ROMK wird durch viele Faktoren beeinflusst, die entweder die Funktion des Kanals in der Plasmamembran direkt regulieren oder dessen Expression an der Zelloberfläche verändern. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Phosphorylierung durch Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen und die Dephosphorylierung durch die zugehörigen Proteinphosphatasen. Weitere modulatorische Faktoren sind freie Fettsäuren, Phospholipide, Nukleotide und Hormone, sowie der zytosolische pH-Wert und der Kaliumspiegel im Blut (Hebert *et al.*, 2005; Wang, 2006).

Der native und der heterolog exprimierte ROMK-Kanal werden durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Wang & Giebisch, 1991; McNicholas *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1996). Die Aktivierung wird durch ein bisher nicht identifiziertes AKAP (*A Kinase Anchoring Protein*) vermittelt (Ali *et al.*, 1998), das die Kinase in räumliche Nähe zum Kanal bringt (Mochly-Rosen, 1995). Man nimmt an, daß die PKA-abhängige Aktivierung von ROMK der Regulation des renalen Kaliumtransports durch das antidiuretische Peptidhormon Vasopressin zugrunde liegt, das eine verstärkte Salzresorption und Wasserretention in der Niere bewirkt (Cassola *et al.*, 1993). Für die

vollständige Kanalaktivierung müssen drei Stellen im Protein phosphoryliert werden, die sich im N- (Serin 44) und C-Terminus (Serin 219 und Serin 313) befinden (MacGregor *et al.*, 1998). Während die Phosphorylierung der beiden C-terminalen Serinreste die pH- (Leipziger *et al.*, 2000) und PIP<sub>2</sub>-abhängige Aktivierung moduliert (Huang *et al.*, 1998; Liou *et al.*, 1999) und so die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht (MacGregor *et al.*, 1998), bewirkt die Phosphorylierung des N-terminalen Serinrestes eine Zunahme der Kanalproteine in der Zellmembran (MacGregor *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 2003).

Serin 44 wird auch durch die Serum- und Glukocorticoid-regulierte Kinase SGK1 phosphoryliert (Yoo *et al.*, 2003), wodurch der Transport von neu synthetisierten Kanalproteinen an die Plasmamembran und damit deren Anzahl dort erhöht wird (Yoo *et al.*, 2003, 2005; O'Connell *et al.*, 2005). Diese Serin/Threonin-Kinase stimuliert auch die Zelloberflächenexpression des epithelialen Natriumkanals ENaC (Debonneville *et al.*, 2001) und wird ihrerseits in ihrer Zelloberflächenexpression durch das NHERF-2-Protein (*Sodium Proton Exchanger Regulatory Factor-2*) verstärkt (Yun *et al.*, 2002). Die Stimulierung beider Kanäle durch SGK1 spiegelt die Aldosteron-abhängige Regulation der Natriumreabsorption sowie der Kaliumsekretion im Sammelrohr der Niere wider (Yoo *et al.*, 2003; Eaton *et al.*, 2001).

Durch die Proteinkinase C (PKC) wird die Aktivität von ROMK1 im CCD gehemmt. Dies beruht aber nicht auf der Phosphorylierung des Kanalproteins selber, sondern auf einer PKC-abhängigen Hemmung der PIP<sub>2</sub>-vermittelten Aktivierung von ROMK (Wang & Giebisch, 1991; Huang *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2003). Die Stimulierung von PKC führt zudem durch verstärkte Endozytose zu einer Abnahme der Kanalproteine in der Zellmembran. Die Hemmung von ROMK1 durch Arachidonsäure wird vermutlich ebenfalls durch die Stimulation von PKC vermittelt (Wang *et al.*, 1992; Macica *et al.*, 1996). Eine wichtige Funktion spielt dabei sehr wahrscheinlich die Phosphorylierung von Serin 4, das sich nur im extremen N-Terminus von ROMK1 befindet (Macica *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2002a). Im Unterschied zum CCD aktiviert PKC in heterologen Expressionssystemen nach Stimulation der Proteintyrosinkinase (PTK) die Oberflächenexpression von ROMK1. So war nach dem Austausch von Serin 4 und Serin 201 zu Alanin die Oberflächenexpression von ROMK1 in Oozyten signifikant erniedrigt (Lin *et al.*, 2002a), was darauf hindeuten könnte, daß PKC einerseits die Oberflächenexpression von ROMK1 im CCD stimuliert, aber andererseits die Aktivität des membranständigen Kanals inhibiert (Wang, 2006).

Eine weitere Kinase, die an der Regulation von ROMK beteiligt ist, ist die Serin/Threonin-Kinase WNK4 (*With No lysin (K) 4*), die im DC und CCD des Nephrons vorkommt und die Oberflächenexpression von ROMK und des Thiazid-sensitiven Natrium-Chlorid-Kotransporters hemmt (Kahle *et al.*, 2003). Während der Kotransporter nach direkter Phosphorylierung durch Endozytose aus der Membran entfernt wird (Wilson *et al.*, 2003), scheint bei ROMK hierfür allein die physikalische Interaktion mit WNK4 auszureichen, um die Clathrin-abhängige Endozytose herbeizuführen. Hierfür spricht, daß eine Kinase-inaktive WNK4-Mutante noch die Endozytose

verstärkt, aber Mutation des NPNF-Sequenzmotivs, das für die Bindung notwendig ist, die WNK4-vermittelte Hemmung des Kanals aufhebt (Kahle *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2002).

Proteintyrosinkinassen (PTK) der Src-Familie werden in den Epithelzellen des CD und CCD exprimiert (Moral *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004). Bei geringer Kaliumaufnahme führt eine PTK-abhängige Phosphorylierung von ROMK1 am C-terminalen Tyrosin 337 zur Endozytose des Kanalproteins und somit zu einer verminderten Kaliumsekretion im Sammelrohr. Eine erhöhte Kaliumaufnahme hat dagegen eine verminderte Phosphorylierung und gesteigerte Oberflächenexpression des Kanals zur Folge (Wei *et al.*, 2000, 2001; Lin *et al.*, 2002b; Sterling *et al.*, 2002, 2003; Chu *et al.*, 2003).

Für eine steigende Zahl von Ionenkanälen und Transportern wird das Membranlipid PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) als Aktivator beschrieben (Hilgemann *et al.*, 2001). Negative Ladungen im PIP<sub>2</sub>-Molekül interagieren hierbei mit positiv geladenen, basischen Aminosäuren im C-Terminus vieler Kir-Kanäle (Huang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Shyng *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2002). Die Mutation dieser, für die PIP<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung wichtigen Aminosäuren im ROMK-Protein, kann deshalb zum Funktionsverlust und Bartter-Syndrom führen (Lopes *et al.*, 2002).

Der Aktivator PIP<sub>2</sub> wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) in das inaktive PIP<sub>3</sub> überführt. Die Expression von PI3K wird wiederum durch eine geringe Kaliumaufnahme erhöht. Somit ist neben PTK auch PI3K an der Hemmung der Kaliumsekretion während eines Kaliummangels beteiligt (Li *et al.*, 2006).

Kürzlich wurde gezeigt, daß die Endozytose von ROMK durch Monoubiquitinierung des N-terminalen Lysin 22 stimuliert wird (Lin *et al.*, 2005). Da Ubiquitinligasen durch Tyrosinphosphorylierung stimuliert werden (Kassenbrock & Anderson, 2004), könnte die Wirkung von PTK auf ROMK indirekt über erhöhte Monoubiquitinierung und nachfolgende Endozytose erfolgen (Lin *et al.*, 2005).

Änderungen des zytosolischen pH-Wertes sind am *Gating* von ROMK beteiligt, wobei eine Ansäuerung den Kanal schließt (Schlatter *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1995). Nach der bisherigen Ansicht bilden hierbei die N-terminalen Aminosäuren Arginin 41 und Lysin 80 sowie das C-terminale Arginin 311 gemeinsam den intrazellulären pH-Sensor (Fakler *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1997; McNicholas *et al.*, 1998). Entsprechend ihrer Bedeutung führen Mutationen dieser Aminosäurereste zum Funktionsverlust des Kanals beim Bartter-Syndrom (Schulte *et al.*, 1999). Die intrazelluläre pH-Sensitivität ist an die extrazelluläre Kaliumkonzentration gekoppelt und wird durch deren Erhöhung zu mehr sauren Werten verschoben. Diese Kopplung führt bei Zunahme der luminalen Kaliumionen zu einem Anstieg der Kanalaktivität, die damit der reduzierten elektrochemischen Triebkraft für die Kaliumsekretion entgegenwirkt, und diese damit aufrechterhält (Doi *et al.*, 1996; Schulte *et al.*, 2001; Sackin *et al.*, 2001; Dahlmann *et al.*, 2004). Kürzlich wurde jedoch beschrieben, daß die Aminosäuren des pH-Sensors intra- und intermolekulare Salzbrücken im ROMK-Kanalprotein ausbilden, die den

geöffneten Zustand des Kanals stabilisieren und für die Kopplung der pH-Sensitivität zum extrazellulären Kalium wichtig sind. Damit ist jedoch die Rolle der drei genannten Aminosäuren als eigentlicher pH-Sensor in Frage gestellt (Leng *et al.*, 2006; Rapedius *et al.*, 2006).

Obwohl die hier beschriebenen Mechanismen die Regulation von ROMK im nativen Gewebe gut widerspiegeln, sind die molekularen Grundlagen bisher nicht in allen Fällen vollständig aufgeklärt. So sind beispielsweise die Proteine, die an der cAMP-induzierten Aktivierung von ROMK durch PKA beteiligt sind, nicht eindeutig charakterisiert (Ali *et al.*, 1998). Ferner gibt es bisher wenige Informationen über die molekularen Prozesse, die den Transport des Kanalproteins vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis zur Plasmamembran regulieren. Weiterhin zeigt der isoliert exprimierte ROMK-Kanal zwar in bezug auf Einzelkanalleitfähigkeit, Offenwahrscheinlichkeit und Rektifizierung in heterologen Systemen eine hohe Übereinstimmung mit der 35 pS-Kaliumleitfähigkeit des distalen Nephrons (Palmer *et al.*, 1997), allerdings bestehen noch Unterschiede in der Pharmakologie der Sulfonylharnstoffe und der Sensitivität gegenüber intrazellulärem ATP (Wang *et al.*, 1995; McNicholas *et al.*, 1996a).

Die native ROMK-Leitfähigkeit ist, vergleichbar dem klassischen  $K_{ATP}$ -Kanal, sensitiv gegenüber intrazellulärem ATP und dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid. Dies hat zu der Annahme geführt, daß ROMK, wie das verwandte Kir6-Protein, auch mit einer entsprechenden Kanaluntereinheit assoziiert, die diese Sensitivitäten im  $K_{ATP}$ -Kanalkomplex vermittelt. Entsprechend dieser Vermutung konnte im heterologen Expressionssystem eine funktionelle Interaktion von ROMK sowohl mit der  $K_{ATP}$ -Untereinheit SUR2B, als auch mit dem CFTR-Protein (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) gezeigt werden. In beiden Fällen wurde eine Sensitivität gegenüber dem Sulfonylharnstoff (McNicholas *et al.*, 1996b; Ruknudin *et al.*, 1998; Tanemoto *et al.*, 2000b; Dong *et al.*, 2001) und mit CFTR zusätzlich eine Hemmung durch intrazelluläres ATP berichtet (Ruknudin *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2006). Zwar konnte damit im heterologen System die für den nativen ROMK-Strom charakteristische Sensitivität gegenüber Sulfonylharnstoff und intrazelluläre Nukleotide nachgeahmt werden, allerdings ist damit noch nicht bewiesen, daß diese beiden Proteine im nativen Gewebe wirklich als Interaktionspartner von ROMK fungieren. Zudem wurde in einer anderen Arbeit berichtet, daß der heterolog exprimierte ROMK-Kanal auch alleine sensitiv gegenüber Glibenclamid sein soll (Konstas *et al.*, 2002).

## 1.7 Fragestellung und methodischer Ansatz

Seit der ersten Charakterisierung von ROMK in der apikalen Membran des TAL haben nachfolgende Untersuchungen gezeigt, daß der native ROMK-Kanal einer vielfältigen Regulation unterliegt, die sowohl die Aktivität des Kanals als auch die Anzahl der an der Zellmembran lokalisierten Kanalproteine moduliert. Die molekularen Mechanismen dieser Regulation und die daran beteiligten Proteine sind jedoch größtenteils noch unbekannt. Bestehende Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften, der Regulation durch intrazelluläre Faktoren und in der Pharmakologie zwischen dem nativen und dem in heterologen Expressionssystemen erzeugten Kaliumstrom lassen zudem auf die Existenz bislang noch unbekannter regulatorischer Untereinheiten oder Interaktionspartner des ROMK-Kanalproteins schließen. Darüber hinaus ist gerade über das *Trafficking* des Kanalproteins vom Endoplasmatischen Retikulum bis hin zur Plasmamembran wenig bekannt, obwohl viele regulatorische Faktoren insbesondere die Zelloberflächenexpression des Kanals beeinflussen. Die genaue Kenntnis der molekularen Zusammensetzung des nativen Kanalprotein-komplexes, sowie die Identität der Interaktionspartner sind deshalb für das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie sowie für eine mögliche therapeutische Nutzung von ROMK als pharmakologisches Zielmolekül von großer Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe eines breiten Methodenspektrums, neue Interaktionspartner des ROMK-Kanals in der Niere zu identifizieren und diese funktionell zu charakterisieren.

Für die Suche nach Interaktionspartnern war der zytoplasmatische C-Terminus des Proteins von besonderem Interesse. Da diese Region bei allen Isoformen identisch ist, mehr als die Hälfte des gesamten Proteins darstellt und an der Regulation des Kanals durch viele zelluläre Faktoren beteiligt ist. Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner sollte eine cDNS-Bibliothek der humanen Niere mit Hilfe eines modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems durchmustert werden. Bei dem verwendeten modifizierten System liegt das Köderprotein in Hefezellen als tetrameres Fusionsprotein vor, wodurch die native Struktur des ROMK-Kanals nachgeahmt wird. Im Anschluß daran sollte die in der Hefe gefundene physikalische Interaktion zunächst durch Koimmunpräzipitations- und danach durch Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz in Säugerzellen bestätigt werden. Der Einfluß der neu identifizierten Interaktionspartner auf die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften des ROMK-Kanals sollte nach Koexpression in *Xenopus* Oozyten mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme analysiert werden. Mögliche Effekte der Interaktionsproteine auf die Zelloberflächenexpression des Kanalproteins sollten mit Hilfe einer Protein- und Oberflächenexpressionsanalyse detektiert werden. Nachfolgende Koexpressionsstudien in Oozyten mit verwandten Kaliumkanälen sollten die Spezifität der gezeigten Interaktionen weiter charakterisieren. Die funktionelle Koexpression von krankheitsverursachenden ROMK-Mutationen sollte zuletzt Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der gefundenen Interaktionspartner bei der Pathophysiologie des Bartter-Syndroms liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Antikörper, genetischen Vektoren, technischen Geräte, Computerprogramme und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Alomone Labs (Jerusalem, Israel), Amersham Biosciences (GE Healthcare, München), Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), Axon Instruments (Foster City, CA, USA), Becton Dickinson Biosciences (Sparks, MD, USA), Biochrom (Berlin), Biometra (Göttingen), Biorad (München), Biozym Scientific (Oldendorf), BMG Labtech (Offenburg), Calbiochem (siehe Merck), Clark Electromedical Instruments (Pangbourne, UK), Clontech (Mountain View, Ca, USA), Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung RZPD (Berlin), DIFCO (siehe Becton Dickinson Biosciences), DNASTAR (Madison, WI, USA), Eppendorf (Hamburg), Eurogentec (Seraing, Belgien), Greiner Bio-One (Frickenhausen), HEKA Elektronik (Lambrecht), Heraeus (Hanau), Immunotech (Marseille, Frankreich), Intas Science Imaging Instruments (Göttingen), Invitrogen (Karlsruhe), Jackson Immuno Research (Cambridgeshire, UK), LiCor Biosciences (Lincoln, NE, USA), Leica (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Menzel (Braunschweig), Microsoft (Unterschleißheim), Minerva Biolabs (Berlin), Molecular Probes (Karlsruhe), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Pall (Dreieich), Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA), Pierce (Bonn), Roche Diagnostics (Mannheim), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Schärfe System (Reutlingen), Sigma (Taufkirchen), Stratagene (La Jolla, CA, USA), Systat Software (Erkrath), Q-BIOgene (Carlsbad, Ca, USA), Qiagen (Hilden), World Precisions Instruments (Sarasota, FL, USA), Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA), Zeitz-Instrumente (Augsburg).

Chemikalien wurden in der höchst zugänglichen Reinheit eingesetzt. Die Lagerung von Chemikalien, Enzymen und Antikörpern, sowie der Betrieb technischer Geräte erfolgten nach Angaben der Hersteller.

### 2.2 Hefestämme

Tabelle 1: Hefestämme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109*	Clontech

\* Genotyp: MATa, trp1–901, leu2–3, 112, ura3–52, his3–200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ

## 2.3 Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
<i>E.coli DH5a</i>	Invitrogen
<i>One Shot TOP10 Electrocomp E.coli</i>	Invitrogen

## 2.4 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
Flp-In-293 (Humane embryonale Nierenzellen)	Invitrogen
COS-7 (Nierenzellen des <i>African Green Monkey</i> )	-

## 2.5 Antikörper

Tabelle 4: Primäre und sekundäre, Fluorophor- bzw. Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Verdünnungen / Konzentrationen				Hersteller
		Western	IF	SEA	IP	
Anti-HA High Affinity (Ratte)	HA-Tag	1:1000	-	1:200	-	Roche
Anti-FLAG (Maus)	FLAG-Tag	1:5000	1:1000	-	-	Sigma
Anti-ROMK (Kaninchen)	rROMK1 (342-391)	1:500	1:100	-	-	Alomone
EZview Red Anti-HA Affinity Gel (Maus)	HA-Tag	-	-	-	40 µl/ml	Sigma
EZview Red Anti-FLAG Affinity Gel (Maus)	FLAG-Tag	-	-	-	40 µl/ml	Sigma
Alexa Fluor 680 Anti-Maus IgG (Ziege)	-	1:2500	-	-	-	Molecular Probes
Alexa Fluor 680 Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	-	1:2500	-	-	-	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 Anti-Maus IgG (Ziege)	-	-	1:1000	-	-	Molecular Probes
Alexa Fluor 546 Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	-	-	1:1000	-	-	Molecular Probes
Peroxidase-gekoppeltes Anti-Ratte IgG (Ziege)	-	-	-	1:500	-	Amersham Biosciences

Western: Western-Transferanalyse (Western Blot), IF: Immunfluoreszenz, SEA: Oberflächenexpressionsanalyse (Surface Expression Assay), IP: Immunpräzipitation



## 2.6 Genetische Konstrukte

Für die heterologe Expression der untersuchten Proteine in Hefe- oder Säugerzellen bzw. die *in vitro* Synthese von cRNS wurden die entsprechenden cDNS in Vektoren inseriert. Diese besitzen für die Amplifikation und Selektion in Bakterien einen bakteriellen Replikationsursprung (*ori*) und einen Selektionsmarker unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors, der für eine Antibiotikumsresistenz gegen Ampicillin oder Kanamycin kodiert. Sie verfügen außerdem über eine *Multiple Cloning Site* (MCS), die mehrere Restriktionsschnittstellen enthält. In die MCS kann fremde DNS eingefügt werden, ohne daß *ori*, Selektionsmarker oder andere Bestandteile des Vektors beeinflusst werden. Vektoren, die zur autonomen Replikation sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen bzw. Hefe fähig sind, werden als *Shuttle-Vektoren* bezeichnet. Diese verfügen neben dem bakteriellen Replikationsursprung (pUC *ori*) noch über einen weiteren für die Replikation in Säugerzellen (SV40 *ori*) bzw. Hefe ( $2\mu$  *ori*).

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden die Vektoren pGBKT7, pGAD10, pACT2 und pGADT7 (alle Clontech) verwendet, bei denen die inserierte cDNS als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne oder der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne, sowie einem Kernlokalisierungssignal exprimiert wird. Für die heterologe Expression in Hefe wird der konstitutiv aktive Promotor der Alkoholdehydrogenase ( $P_{ADHI}$ ) verwendet. Die Selektion in Hefe erfolgte mit Hilfe des TRP1- bzw. LEU2-Gens. TRP1 und LEU2 ermöglichen auxotrophen Hefen das Wachstum auf synthetischen, selektiven Medien, die Tryptophan bzw. Leucin nicht enthalten.

Als Köderkonstrukt für die Durchmusterung von cDNS-Bibliotheken der humanen Niere wurde der C-Terminus von rROMK1 (NM\_017023, Aminosäuren 167-391) in pGBKT7 kloniert. Dabei wurde eine mutierte Variante des GCN4-Leucinzipperdomäne (Harbury *et al.*, 1993; Zerangue *et al.*, 2001) zwischen den C-Terminus von ROMK und die DNS-Bindungsdomäne eingefügt (rROMK1(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7). Die Aminosäuresequenz der Leucinzipperdomäne mit Übergängen lautet: GGGSGSRMKQIEDKLEELSKLYHIENELARIKLLGERGGSGSAA (Leucinzipperdomäne ist unterstrichen). Für Kontrollexperimente wurden anstelle des C-Terminus des Ratten-ROMK der C-Terminus des humanen ROMK (NM\_153764) (hROMK1(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7) oder das *Enhanced Green Fluorescence Protein* (EGFP-Leucinzipper / pGBKT7) verwendet. Die untersuchten cDNS-Bibliotheken waren in pGAD10 bzw. pACT2 kloniert.

Für Bindungsstudien mit dem Beutekonstrukt Golgin-160(614-849) / pGAD10 und zehn C-terminalen ROMK-Bartter-Mutanten wurden anstelle des Wildtyps die C-Termini der humanen ROMK-Mutanten A198T, L220F, A306T, R311W, Y314C, L320P, R324L, F325C, 362X und 368X eingesetzt.

Kontrollexperimente mit dem Beuteprotein CDR62(121-332) wurden mit einem N-terminal um 26 Aminosäuren verkürzten Fusionskonstrukt (hCDR62(147-332) / pGADT7) durchgeführt.

Für die Validierung des verwendeten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde die Interaktion zwischen den C-Termini der HCN2- und HCN4-Kationenkanäle (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels*) und den C-Termini der regulatorischen KCNE-Kanaluntereinheiten sowohl mit dem klassischen als auch mit dem modifizierten System untersucht. Dazu wurden die C-Termini von hHCN2 (NM\_001194, Aminosäuren 468-889) und hHCN4 (NM\_005477, Aminosäuren 519-1203) mit und ohne die Leucinzipperdomäne in pGBKT7 und die C-Termini von KCNE1 (NM\_000219, Aminosäuren 67-129), KCNE2 (NM\_172201, Aminosäuren 73-123), KCNE3 (NM\_005472, Aminosäuren 81-103) und KCNE4 (NM\_021342, Aminosäuren 59-170) in pGADT7 inseriert.

Für die *in vitro* Synthese von cRNS mit Hilfe der DNS-abhängigen T7-RNS-Polymerase wurde pSGEM verwendet (Hollmann *et al.*, 1994). Dieser Vektor enthält neben dem T7-RNS-Polymerase-Promotor noch die 5' und 3' untranslatierten Regionen des beta-Globingens aus *Xenopus laevis*, die die cRNS nach der Injektion in Oozyten stabilisieren.

Folgende cDNS wurden in pSGEM inseriert: hROMK2 (NM\_153764), rROMK1-HA (NM\_017023), hROMK2-Mutanten (A198T, L220F, A306T, R311W, Y314C, L320P, R324L, F325C, 362X, 368X), hKir2.1 (NM\_000891), hKir2.1-PC, hKir2.2 (NM\_021012), hKir2.3 (NM\_152868), hKir2.4 (NM\_170720), hKv1.5 (NM\_002234), hKv4.3 (NM\_004980), HERG (NM\_000238), Golgin-160-FLAG (NM\_005895), GM130 (NM\_004486), hGRB2 (NM\_002086), hGRB7 (NM\_005310), hGRB10 (NM\_005311), hSGK1 (NM\_005627), hSGK1(S422D), hSGK1(T256A/S422A), hPP2A B56 $\beta$  (NM\_006244), hNRF2 (NM\_006164), hCDR62 (NM\_001802), hC13orf22 (NM\_005800), hTNRC5 (NM\_006586).

Für die Expression rekombinanter Proteine in Säugierzellen wurden die Vektoren pcDNA3, pcDNA3.1, pCMV-HA (alle Invitrogen), sowie pEGFP-C1 (Clontech) verwendet, die über die starke *Enhancer-Promoter-Region* des Cytomegalovirus ( $P_{CMV}$ ) verfügen. Bei Verwendung von pCMV-HA bzw. pEGFP-C1 werden die inserierten cDNS als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Hämagglutinin-Antigen-Epitop des humanen Influenzavirus (HA-Tag: YPYDVPDYA) bzw. dem *Enhanced Green Fluorescence Protein* (EGFP) aus der Qualle *Aequoria victoria* (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994) exprimiert.

ROMK2 wurde in pcDNA3 (hROMK2 / pcDNA3) und das N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusionierte Golgin-160 in pcDNA3.1 Zeo(-) eingefügt (hGolgin-160-FLAG / pcDNA3.1 Zeo(-)). Der C-Terminus von ROMK wurde in pCMV-HA inseriert (hROMK1(167-391) / pCMV-HA) und ROMK1 in pEGFP-C1 (hROMK1 / pEGFP-C1).

PCR-Fragmente wurden zunächst in pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) ligiert und anschließend für die Expression in Hefe- oder Säugerzellen bzw. für die RNS-Synthese in die oben beschriebenen Plasmide umgesetzt.

Die für die Herstellung der genetischen Konstrukte angewandten Methoden werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Informationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sowie den hergestellten bzw. verwendeten Konstrukten sind in tabellarischer Form im Anhang aufgeführt. Die Sequenzen aller Konstrukte wurden durch automatisierte DNS-Sequenzierung überprüft.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Medien für die Anreicherung von Bakterien

Für die Anreicherung von Bakterien wurde LB(Luria Bertani)-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: 1% (w/v) Bacto-Trypton (Becton Dickinson), 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Becton Dickinson), 1% (w/v) NaCl (Sigma) in deionisiertem Wasser, pH 7,0. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar (Becton Dickinson). Das Medium wurde zum Sterilisieren für 20 min bei 120°C autoklaviert. Selektiven Medien wurden nach dem Abkühlen auf ca. 60°C 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin (beides Sigma) zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Medien mit Antibiotikum wurden innerhalb von zwei Wochen verwendet.

Für die Regeneration der Bakterien nach der Transformation wurde SOC-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: 2% Trypton (*Bacto Trypton*, Becton Dickinson), 0,5% Hefe-Extrakt (*Bacto Yeast Extract*, Becton Dickinson), 0,4% Glukose (Sigma), 10 mM NaCl (Sigma), 2,5 mM KCl (Merck), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck), 5 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck) in deionisiertem Wasser, pH 7,0. Nach dem Autoklavieren wurde dem kalten Medium je Liter 10 ml einer 40%igen Glukoselösung steril hinzugegeben. Das Medium wurde zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.7.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Während der frühlogarithmischen Wachstumsphase ist es möglich, die Membran von Bakterien für Fremd-DNS durchlässig zu machen. Derart vorbehandelte Bakterien werden als kompetent bezeichnet (Dower, 1990). Mit 1 ml einer Vorkultur von *E.coli DH5 alpha* (Invitrogen) wurden 250 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> 0,5-0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde im Anschluß für 15 min in einem Eisbad gekühlt und für 20 min bei 2000xg und 4°C zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 250 ml eiskaltem,

sterilem, deionisiertem Wasser, wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen, für 10 min bei 2000xg und 4°C zentrifugiert und abschließend in eiskaltem 20% Glycerin aufgenommen. Das Volumen entsprach dabei in etwa dem Volumen des Bakterienpellets. Aliquots von 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. *One Shot TOP10 Electrocomp E. coli* wurden bereits kompetent von Invitrogen bezogen.

### 2.7.3 Elektroporation

Mit Hilfe der Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) kann DNS in Bakterien transformiert werden. Diese Methode beruht auf der Beobachtung, daß kurze Hochspannungspulse "Löcher" in der Zellhülle verursachen, durch welche dann exogene DNS aus der Umgebungslösung in die Zelle aufgenommen werden kann. Für die Transformation elektrokompenter *E. coli DH5-alpha* und *One Shot TOP10* (beide Invitrogen) wurden 50 µl der Zellsuspension auf Eis aufgetaut, mit 5-20 ng Plasmid-DNS bzw. 1-2 µl Ligationsansatz vermischt, in gekühlte Elektroporationsküvetten (*Gene Pulser*, Elektrodenabstand: 2 mm, Biorad) überführt und bei einer Spannung von 2 kV, einem Widerstand von 400 Ω und einer Kapazität von 25 µFD transformiert (*Gene Pulser*, Biorad). Die Bakteriensuspension wurde sofort in 1 ml, auf 37°C vorgewärmtem SOC-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für 60 min bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Je 100 µl Bakteriensuspension wurden auf selektiven LB-Nährmedien ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformationseffizienz lag bei dem verwendeten System bei bis zu 10<sup>9</sup> Transformanten pro µg eingesetzter DNS.

### 2.7.4 Amplifikation und Präparation von Plasmiden

Bakterien wurden mit den zu amplifizierenden Plasmiden transformiert und auf selektiven LB-Nährmedien ausgestrichen. Einzelne Kolonien dienten als Inokulum für Übernachtflüssigkulturen. Die Präparation von Plasmid-DNS für analytische Zwecke erfolgte aus einem Kulturvolumen von 3 ml mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* und für präparative Zwecke aus einem Volumen von 25 bzw. 100 ml mit dem *QIAfilter Plasmid Midi Kit* bzw. dem *QIAfilter Plasmid Maxi Kit*. Für die Transfektion in Säugerzellen wurde die Plasmid-DNS aus einem Volumen von 100 ml mit Hilfe des *Endo Free Plasmid Maxi Kit* isoliert. Die Präparation der cDNS-Bibliothek erfolgte mit dem *Plasmid Giga Kit* (alle Qiagen). Isolierte Plasmide wurden zur Kontrolle analytisch verdaut. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.7.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNS und RNS wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf). Eine Absorption von 1 bei 260 nm ( $A_{260}$ ) entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNS bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNS. Um die Verunreinigung mit Protein abzuschätzen, wurde zusätzlich  $A_{280}$  bestimmt. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte bei  $1,8 \pm 0,2$  liegen.

### 2.7.6 Restriktionsverdau von DNS

Typ-2-Restriktionsendonukleasen spalten DNS in Gegenwart von Magnesiumchlorid durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen, palindromischen Sequenzen aus 4-8 Nukleotiden. Dabei entstehen in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder einsträngig-überhängende Enden (*Sticky Ends*) oder doppelsträngig-stumpfe Enden (*Blunt Ends*). Bei einem finalen Volumen von 30  $\mu\text{l}$  enthielt ein analytischer Verdau 1-2  $\mu\text{g}$  DNS und 5-10 U Restriktionsenzym, ein präparativer Ansatz enthielt bis zu 5  $\mu\text{g}$  DNS und 10-20 U Restriktionsenzym (NEB, New England Biolabs). Puffer und Temperatur für die DNS-Hydrolyse mit einem, zwei oder drei Restriktionsenzymen wurden nach den Angaben von NEB gewählt. Die Inkubationszeit betrug in Abhängigkeit von Enzym, Enzymkonzentration und eingesetzter DNS-Menge 2-6 h. Die DNS-Fragmente wurden im Anschluß mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und wenn nötig aus dem Gel eluiert. Linearisierte Plasmid-DNS für die cRNS-Synthese wurde mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) gereinigt.

### 2.7.7 Herstellung von *Blunt Ends*

War es bei einer Klonierung nicht möglich, durch geeignete Restriktionsendonukleasen auf einer oder beiden Seiten komplementäre Enden für eine Ligationsreaktion zu erzeugen, konnten beliebige *Sticky Ends* nachträglich mit Hilfe der T4-DNS-Polymerase zu *Blunt Ends* modifiziert werden.

Ein Ansatz mit einem finalen Volumen von 40  $\mu\text{l}$  enthielt bis zu 5  $\mu\text{g}$  verdaute, ungereinigte DNS, 1 U T4-DNS-Polymerase (Invitrogen), 4  $\mu\text{l}$  10-fach T4-DNS-Polymerase-Puffer (Invitrogen) und 10 mM dNTPs (2,5 mM je dNTP, Sigma). Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37°C. Im Anschluß wurden Vektor und cDNS-Fragmente über ein Agarosegel gereinigt und für Ligationsreaktionen eingesetzt. Nach Modifikation nur einer Seite wurden bei Vektor und Fragment nach der Reinigung auf der anderen Seite komplementäre, überhängende Enden erzeugt.

### 2.7.8 Dephosphorylierung

Durch Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (Orthophosphorsäure-Monoester-Phosphohydrolase) kann die Rezirkulation eines linearisierten Vektors bei Ligationsreaktionen verhindert werden. Phosphodiesterbindungen innerhalb von Nukleinsäuremolekülen werden dabei nicht hydrolysiert. Nach der Linearisierung eines Vektors wurde ein 20 µl Restriktionsansatz ohne vorherige Reinigung für 5 min bei 37°C mit 1 U alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, *CIAP*, Invitrogen/Gibco) inkubiert. Der dephosphorylierte Vektor wurde im Anschluß über ein Agarosegel gereinigt und für Ligationsreaktionen eingesetzt.

### 2.7.9 DNS-Agarosegelelektrophorese

DNS-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese für analytische und präparative Zwecke entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Dazu wurden Gele mit 1,0-1,5% Agarose (*Certified Molecular Biology Agarose*, Biorad), 1 µg/ml Ethidiumbromid (Biorad) und TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0, Invitrogen) verwendet. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. DNS-Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladebuffer (*5x Nucleic Acid Sample Loading Buffer*, Biorad) gemischt. Die Fragmentgrößen wurden mit Hilfe folgender Größenstandards bestimmt: 100 bp (100-1000 bp), 500 bp (500-5000 bp), 1 kb (1-10 kb) (alle Biorad). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100-120 V für 30-60 min. Die Gele wurden anschließend auf einem UV-Transilluminator (TI1, Biometra) mit Hilfe eines digitalen Gel-Dokumentationssystems (Intas Science Imaging Instruments) ausgewertet. Für präparative Zwecke wurden DNS-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNS mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) eluiert.

### 2.7.10 Ligation

In den meisten Fällen wurden gerichtete Ligationen durchgeführt, bei denen das einzufügende Fragment nur in der gewünschten Orientierung eingebaut wurde. Dies wurde durch die Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme erreicht, die an den 3'- und 5'-Enden von Fragment und Vektor verschiedene *Sticky Ends* erzeugten. Dies traf auch auf Ligationen zu, bei denen Fragment und Vektor ein *Sticky End* und ein *Blunt End* hatten. In seltenen Fällen wurden durch Verwendung beidseitig identischer *Sticky Ends* oder zweier *Blunt Ends* ungerichtete Ligationen durchgeführt. Da es dabei aufgrund komplementärer Enden auch ohne den Einbau des DNS-Fragmentes zu einer Rezirkulation des Vektors kommen konnte, wurde in diesen Fällen das 5'-Phosphatende des Vektors vor der Ligation dephosphoryliert. Eine Rezirkulation des Vektors war somit nicht möglich.

Ein Ligationsansatz mit einem finalen Volumen von 20 µl enthielt 1 U T4 DNS-Ligase (Invitrogen), 4 µl 5-fach T4 DNS-Ligase-Puffer (Invitrogen), 50-100 ng des linearisierten Vektors, sowie das einzufügende DNS-Fragment in einem 3-molaren Überschuß zum Vektor. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne das einzufügende Fragment. Die Inkubationszeit für Ansätze mit überhängenden Enden lag mit 16 h bei 18°C, bei stumpfen Enden abgesenkt bei 14°C. Abschließend erfolgte die Denaturierung der Ligase durch eine Inkubation für 10 min bei 65°C. Die Ligationsansätze wurden bis zur Transformation bei 4°C gelagert.

### 2.7.11 Konstruktion von Oligonukleotid-Starter-Molekülen (*Primern*)

Die Sequenzen der verwendeten *Primer* wurden von *GenBank*-Einträgen bzw. Vektorsequenzen abgeleitet. Sie hatten eine Länge zwischen 18 und 38 Basen und einen GC-Gehalt von 40-60%. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ), definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der *Primer* mit der DNS-Matrize hybridisieren, lagen zwischen 45°C und 82°C und konnten näherungsweise durch die Formel  $T_m = 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})+4^\circ\text{C}(\text{C}+\text{G})$  berechnet werden. Die Schmelztemperaturen sowie die mögliche Bildung von Dimeren und Haarnadelstrukturen wurden mit Hilfe von *PrimerSelect* (*Lasergene*, DNASTAR) berechnet bzw. analysiert. Die verwendeten Primer enthielten am 3'-Ende nicht mehr als zwei Guanin- oder Cytosin-Basen, da diese unspezifische Hybridisierungen mit der Matrizen-DNS stabilisieren würden. Ebenso wurde auf eine 3'-Thymin-Base verzichtet, da diese eher zu Fehlern führen würde als andere Basen. Die Basen am 5'-Ende sind für die Hybridisierung weniger kritisch. An dieser Stelle wurden Sequenzabschnitte für neue Restriktionsschnittstellen ergänzt. Nicht komplementäre Überhänge am 5'-Ende entsprachen maximal der Hälfte der Sequenz. Punktmutationen befanden sich mittig und waren beidseitig von mindestens zehn komplementären Nukleotiden umgeben. *Primer* stammten von den Firmen Eurogentec, Sigma und Qiagen und sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

### 2.7.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) diente der *in vitro* Amplifikation doppelsträngiger DNS, dem Einfügen von Punktmutationen und neuer Restriktionsschnittstellen (Ho *et al.*, Gene 1989), der Elongation und Trunkation von genetischen Konstrukten sowie analytischen Zwecken mit Hilfe der Kolonie-PCR (Gussow & Clackson, 1989). Ein PCR-Ansatz mit einem finalen Volumen von 20 µl enthielt 4 mM dNTPs (1 mM je dNTP, Sigma), je 1 µmol/µl der beiden *Primer* (Sigma, Qiagen), 100-300 ng Matrizen-DNS, 2,5 U Pfu (*Pyrococcus furiosus*)-DNS-Polymerase (Stratagene), 2 µl 10-fach Pfu-Reaktionspuffer (Stratagene) und bei GC-reicher Matrizen-DNS optional 5% DMSO (Sigma). Die Amplifikation erfolgte in einem T3 Thermocycler (Biometra) unter den in Tabelle 5 aufgeführten Reaktionsbedingungen. Die Hybridisierungstemperatur lag standardmäßig bei 50°C und wurde nur

beim Auftreten von Nebenprodukten schrittweise erhöht. Bei der Verwendung von Mutagenese-*Primern*, die nicht vollständig zu der Matrizen-DNS komplementär waren, wurden die ersten fünf Zyklen mit einer geringeren Hybridisierungstemperatur von 40-45°C durchgeführt. Anschließend lag, erfahrungsgemäß ausreichend, ein mutiertes Produkt vor, das in den weiteren Zyklen unter stringenteren Bedingungen als Matrize diente.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
I	1	Denaturierung	3 min	95°C
II	25	Denaturierung	30 s	95°C
		Hybridisierung	30 s	50-65°C*
		Synthese	1 min/kb	72°C
III	1	Endsynthese	10 min	72°C
IV	1	Kühlung	unbegrenzt	4°C

\* Die Hybridisierungstemperatur lag standardmäßig bei 50°C und wurde nur beim Auftreten von Nebenprodukten schrittweise erhöht.

### 2.7.13 Kolonie-PCR

Zum schnellen Nachweis einer erfolgreichen Ligation wurde eine Kolonie-PCR (Gussow & Clackson, 1989) durchgeführt. Dazu wurde zu einem PCR-Ansatz von 20 µl, der alle Komponenten bis auf die Matrizen-DNS enthielt, eine kleine Menge einer Bakterienkolonie gegeben. Im ersten Denaturierungsschritt wurde die Zellwand der Bakterien durch Thermolyse zerstört und die Plasmide freigesetzt. Mit Hilfe von flankierenden *Primern* wurde das ligierte DNS-Fragment amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert. Banden in der Größe der inserierten Fragmente zeigten erfolgreiche Ligationen.

### 2.7.14 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung diente der schnellen und einfachen Klonierung von PCR-Produkten. Anstelle einer Ligase wurde dabei eine DNS-Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus eingesetzt, die neben den Eigenschaften einer Restriktionsendonuklease auch die einer Ligase besitzt. TOPO-Vektoren werden linearisiert und TOPO-aktiviert angeboten, d.h. die Topoisomerasen sind kovalent an die beiden 3'-OH-Enden des linearisierten Vektors gebunden. Die Topoisomerasen lösen sich erst nach Ligation des DNS-Fragmentes und verhindern so durch sterische Blockade die Rezirkulation des leeren Vektors. Da Vektor und Enzym einen gemeinsamen Komplex bilden, verbessert sich die Kinetik im Vergleich zur klassischen Ligation von einer Reaktion dritter Ordnung zu einer Reaktion zweiter Ordnung. Es wurde das *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* (Invitrogen) verwendet, das speziell für die Klonierung von PCR-Produkten mit *Blunt Ends* ausgelegt ist, die mit der in dieser



Arbeit verwendeten *Pfu*-DNS-Polymerase erzeugt werden. Ein Reaktionsansatz mit einem finalen Volumen von 6  $\mu$ l enthielt 0,5-4  $\mu$ l ungereinigten PCR-Ansatz, 1  $\mu$ l TOPO-Salzlösung (Invitrogen) und 1  $\mu$ l TOPO-aktivierten Vektor (pCR-Blunt II-TOPO, Invitrogen). Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde 1  $\mu$ l dieses Ansatzes mit Hilfe der Elektroporation in *One Shot TOP10 Electrocomp E. coli* (Invitrogen) transformiert.

### 2.7.15 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNS wurde mit Hilfe der *Cycle*-Sequenzierung durchgeführt (Parker *et al.*, 1996). Diese leitet sich von der Sanger-Coulson-Sequenzierung ab (Sanger & Coulson, 1977), nutzt aber im Gegensatz dazu ddNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen, sogenannten *Dye Terminatoren*, anstelle einer radioaktiven Markierung. Daher kommt sie mit einem einzigen Reaktionsansatz aus. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der *AmpliTaq FS*-DNS-Polymerase in Verbindung mit dem *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (beides Applied Biosystems). Die denaturierten PCR-Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Elektrophorese, Detektion und Analyse der Sequenzierprofile erfolgte automatisch mit Hilfe des *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzers* (Applied Biosystems). DNS-Sequenzierungen führten Frau Christiane Metz-Weidmann und ihre Mitarbeiterinnen in der Abteilung *Genomic Sciences* durch.

### 2.7.16 Vergleich und Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen

Nukleotid- und Proteinsequenzen importierten wir digital von *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) bzw. *Swiss-Prot/TrEMBL* (Schweizerisches Institut für Bioinformatik). Unbekannte DNS-Sequenzen ließen sich mit Hilfe von *NCBI BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) identifizieren. Die Topologien der untersuchten Proteine leiteten sich aus den Datenbankeinträgen von *InterPro*, *Pfam* und *ProDom* ab. Ihre Expressionsmuster wurden den Datenbanken *Ascenta*, *Gene Logic* entnommen. Das Erstellen von Restriktionskarten, die Konstruktion von Oligonukleotid-Starter-Molekülen (*Primern*), sowie die Vergleiche und Analysen von Nukleotid- und Proteinsequenzen geschah mit Hilfe von *Lasergene* (DNASTAR).

### 2.7.17 cRNS-Synthese

Zur funktionellen Untersuchung von Ionenkanälen und interagierenden Proteinen wurde deren cDNS in einer *in vitro* Reaktion mit Hilfe des *T7 mMESSAGE mMACHINE Kit* (Ambion) in cRNS umgeschrieben und diese in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Als DNS-Matrizen dienten cDNS-Konstrukte im pSGEM-Vektor (Hollmann *et al.*, 1994). Diese wurden 3' vom Polyadenin-Schwanz linearisiert, um die Synthese durch „Abfallen“ der T7-RNS-Polymerase an dieser Stelle zu beenden. Dazu standen folgende Schnittstellen zur Verfügung: NheI, SphI, NsiI, PacI, SfiI. Im Anschluß konnte die mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) gereinigt Matrizen-DNS für die Synthese eingesetzt werden. Die wurde und. Für eine hohe Stabilität und Translationseffizienz war die synthetisierte cRNS (wie die meisten eukaryotischen mRNA) am 5'-Ende mit einer 5'-5'-verknüpften Methylguanosin-Kappe und am 3'-Ende mit einem Polyadenin-Schwanz versehen. Die Bestimmung der cRNS-Konzentration erfolgte photometrisch. Ein Aliquot der RNS wurde zur Qualitätskontrolle auf einem denaturierenden Agarosegel analysiert. Die Lagerung der RNS erfolgte bei -80°C.

### 2.7.18 cRNS-Agarosegelelektrophorese

Für die denaturierende cRNS-Agarosegelelektrophorese wurden Gele mit 1% Agarose (*Certified Molecular Biology Agarose*, Biorad) und MOPS-Puffer (20 mM MOPS (pH 7,0), 8 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA (pH 8,0), Eppendorf) verwendet. 1 µg cRNS wurde in 20 µl Probenpuffer (10 µl deionisiertem N,N-Dimethylformamid (Sigma), 3,5 µl 37% Formaldehyd (Sigma), 6,5 µl MOPS-Puffer (Eppendorf)) und 1 µl Ethidiumbromid (Biorad) aufgenommen, für 10 min bei 65°C inkubiert, kurz auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 5 µl 5-fach Ladepuffer (*Nucleic Acid Sample Loading Buffer*, Biorad) auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente eine RNS-Leiter (0,24-9,5 kb, Invitrogen). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 30-60 min. Die Gele wurden auf einem UV-Transilluminator (TII, Biometra) und mit Hilfe eines digitalen Gel-Dokumentationssystems (Intas Science Imaging Instruments) analysiert.

## 2.8 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Protein-Protein-Interaktionen wurden mit Hilfe des *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3* (Clontech) im Hefestamm AH109 (Tabelle 1) untersucht. Dabei wurde das Ködergen als Fusionsprotein mit der GAL4-DNS-Bindedomäne exprimiert, während das Beutegen bzw. die cDNS-Bibliothek als Fusionsprotein mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert wurde (Fields & Song 1989). Kam es nach Koexpression in Hefe zur Interaktion zwischen den Köder- und Beutefusionsproteinen, wurden DNS-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe zueinander gebracht, was die Transkription der drei Reportergene HIS3, ADE2 und lacZ bewirkte. Die

Expression der Reportergene ermöglichte dem auxotrophen Hefestamm AH109 das Wachstum auf synthetischen, selektiven Medien, die Histidin und Adenin nicht enthielten, und führte zu einer Blaufärbung der Kolonien im  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest.

Für das Durchmustern zweier cDNS-Bibliotheken der humanen Niere (Tabelle 6) diente der zytosolische C-Terminus von rROMK1 (Aminosäure 167-391) als Köder. Eine mutierte Variante der GCN4-Leucinzipperdomäne (Harbury *et al.*, 1993; Zerangue *et al.*, 2001) wurde zwischen den C-Terminus und die DNS-Bindedomäne eingefügt, was eine Tetramerisierung des Fusionsproteins bewirkte. Das Köderprotein ahmte somit die homotetramere Topologie des ROMK-Kanalproteins nach. Für die Selektion in Hefe verfügte das Köderplasmid (pGBKT7, Clontech) über das TRP1-Gen und die Beute-Plasmide (pGAD10, pACT2 und pGADT7, Clontech) über das LEU2-Gen. TRP1 und LEU2 ermöglichen den auxotrophen Hefen das Wachstum auf synthetischen, selektiven Medien, die Tryptophan bzw. Leucin nicht enthalten.

Tabelle 6: Verwendete cDNS-Bibliotheken der humanen Niere\*

Katalog-Nr.	Chargen-Nr.	Vektor	Anz. unabhängiger Klone	Konstruktion (Primer)	Hersteller
HL4005AB	3Z037	pGAD10	4,0x10 <sup>6</sup>	Oligo-dT & random hexamer	Clontech
HL4043AH	7120025	pACT2	3,5x10 <sup>6</sup>	Oligo-dT	Clontech

\* *Human Kidney Matchmaker cDNA Library*

Die cDNS der ersten Bibliothek (HL4005AB) lag bereits amplifiziert vor und konnte direkt eingesetzt werden. Die zweite Bibliothek (HL4043AH) wurde zunächst amplifiziert.

Für die Durchmusterung der cDNS-Bibliotheken wurde zunächst nur das Köderkonstrukt mit Hilfe der kleinen Hefetransformation in AH109-Hefezellen transformiert. In diese Hefe wurde anschließend mit Hilfe der großen Hefetransformation die cDNS-Bibliothek transformiert. Die resultierenden Hefetransformanten wurden durch verschiedene Selektionsschritte auf Interaktion analysiert. Mit positiven Klonen wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest durchgeführt. Die Plasmide der im  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest positiven Hefekolonien wurden isoliert, in *E.coli DH5 $\alpha$*  amplifiziert und einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Anschließend wurden die Beutekonstrukte zusammen mit dem Köderkonstrukt erneut in AH109 transformiert und nochmals auf Interaktion getestet. Der Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

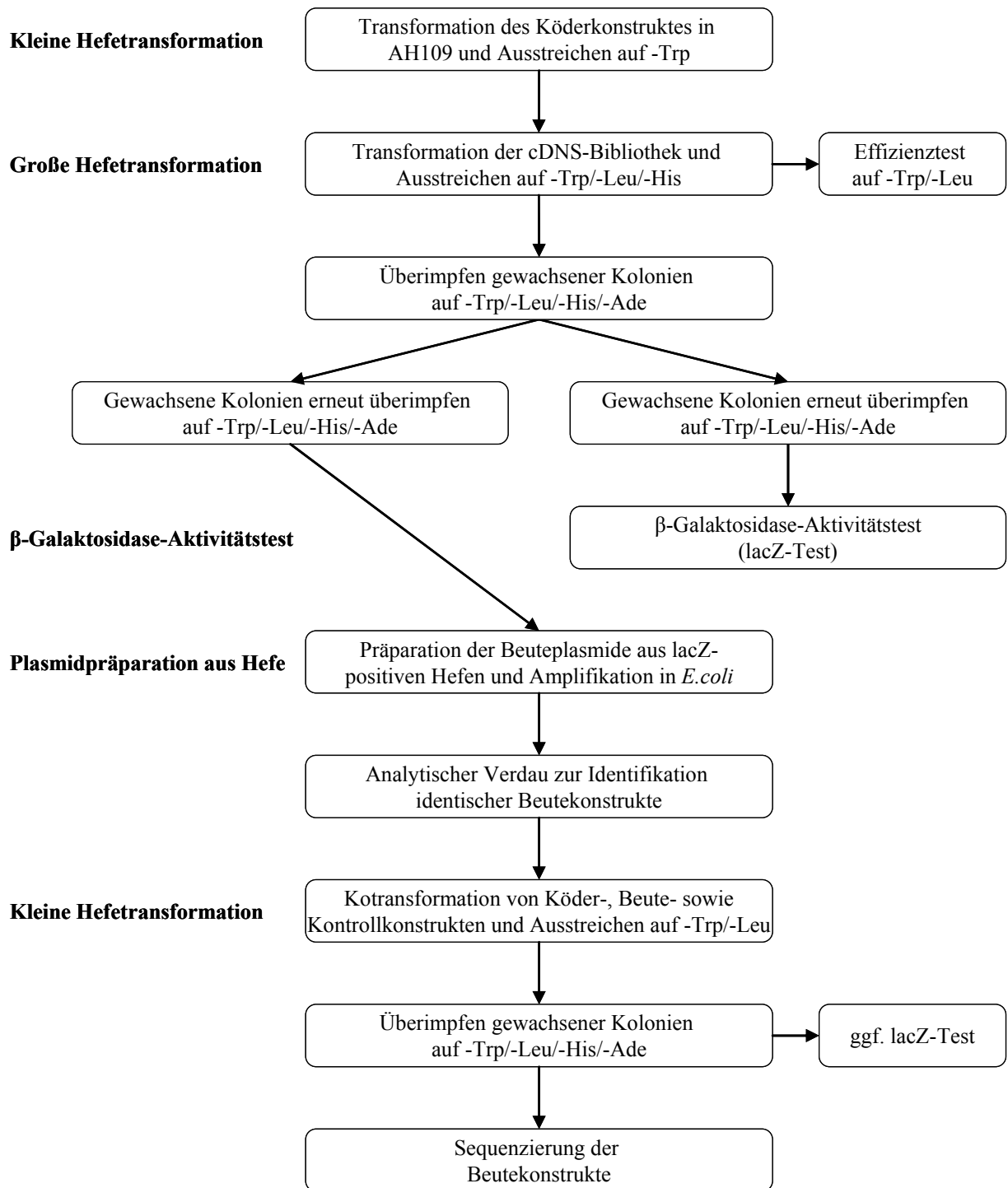


Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays. In den Boxen sind die Arbeitsschritte sowie Selektionsmedien angegeben. Auf der linken Seite wird auf die verwendeten Protokolle verwiesen.

Um autoaktive Konstrukte und falschpositive Interaktionen zu identifizieren, wurden folgende Kontrollen durchgeführt: (1) Transformation von Köder, Beuten und leeren Plasmiden allein; (2) Kotransformation des leeren Beuteplasmids pGAD10 mit dem Köderkonstrukt; (3) Kotransformation des leeren Köderplasmids pGBKT7 mit den Beutekonstrukten; (4) Kotransformation der Beutekonstrukte mit einem Kontrollkonstrukt, das anstelle des C-Terminus von rROMK das *Enhanced Green Fluorescence Protein* (EGFP) enthielt; (5) Kotransformation der Beutekonstrukte mit einem

Köderkonstrukt, das anstelle des C-Terminus von ROMK aus Ratte den humanen C-Terminus enthielt. Isolierte Beutekonstrukte, die für interagierende Proteinfragmente kodierten, wurden durch automatisierte DNS-Sequenzierung analysiert und deren Nukleotidsequenzen mit Hilfe von BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) mit den Datenbankeinträgen von *GenBank* verglichen.

Für die Untersuchung von Interaktionen zwischen dem Beutekonstrukt Golgin-160(614-849) und den C-terminalen Mutanten von ROMK sowie zwischen HCN2/4 und KCNE1-4 wurde nach dem Protokoll der kleinen Hefetransformation verfahren.

Für die Stammhaltung wurde AH109 in YPAD-Medium mit 15% Glycerol vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Transformationen wurde regelmäßig ein Aliquot aufgetaut, auf YPAD-Nährböden ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.8.1 Hefemedien

Für die Anreicherung von Hefen wurde YPAD-Medium mit 1% (w/v) Hefe-Extrakt (*Bacto Yeast Extract*, Becton Dickinson), 2% (w/v) Pepton (*Select Pepton 140*, Invitrogen/Gibco), 2% (w/v) D(+)-Glukose (Sigma) und 40 mg/l Adenin (Q-Biogene) verwendet. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% (w/v) Agar (*Bacto Agar*, Becton Dickinson). Hefe-Extrakt, Pepton und ggf. Agar wurden zunächst in 940 ml deionisiertem Wasser gelöst und zum Sterilisieren für 20 min bei 120°C autoklaviert. Nachdem das Medium auf ca. 50°C abgekühlt war, konnten 50 ml einer 40%igen Glukose-Lösung und 10 ml einer 100-fach konzentrierten Adenin-Lösung (4 g/l) steril hinzugegeben werden.

Die Medien für das Hefe-Zwei-Hybrid-System setzten sich aus 6,7 g/l Stickstoffbasis (*Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids*, Becton Dickinson), 0,65 g/l Aminosäure/Nukleotid-Gemisch (*Complete Supplement Mixture*, Q-Biogene) und 2% Glukose zusammen. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% (w/v) Agar. Für flüssige Medien wurden Stickstoffbasis, Aminosäure/Nukleotid-Pulver und Glukose in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Für Festmedien wurden Medium und Agar getrennt in je 500 ml deionisiertem Wasser angesetzt. Das Medium wurde gelöst und sterilfiltriert. 20 g Agar wurden gelöst und autoklaviert. Nachdem der Agar auf ca. 50°C abgekühlt war, wurden beide Bestandteile unter sterilen Bedingungen miteinander luftblasenfrei gemischt und in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Medien erfolgte für maximal vier Wochen bei 4°C.

Das Aminosäure/Nukleotid-Gemisch setzte sich aus 40 mg/l Adenin, 50 mg/l Arginin, 80 mg/l Aspartat, 20 mg/l Histidin, 50 mg/l Isoleucin, 100 mg/l Leucin, 50 mg/l Lysin, 20 mg/l Methionin,

50 mg/l Phenylalanin, 100 mg/l Threonin, 50 mg/l Tryptophan, 50 mg/l Tyrosin, 20 mg/l Uracil und 140 mg/l Valin zusammen.

Für selektive Medien wurden Aminosäure/Nukleotid-Gemische verwendet, denen ein oder mehrere Bestandteile fehlten. Es wurden flüssige und feste Medien ohne Tryptophan (-Trp), ohne Leucin (-Leu), ohne Tryptophan und Leucin (-Trp/-Leu), ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (-Trp/-Leu/-His) und ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin (-Trp/-Leu/-His/-Ade) verwendet.

### 2.8.2 Amplifikation einer cDNS-Bibliothek

Die cDNS-Bibliothek (HL4043AH) wurde in *E.coli BNN132* in 2 ml LB-Medium mit 25% Glycerol von Clontech bezogen. Der Hersteller gab den Titer mit  $\geq 10^8$  CFU/ml und die Anzahl der unabhängigen Klone mit  $3,5 \times 10^6$  an. Die Zellen wurden für die Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  zunächst auf Eis aufgetaut und zu je 50  $\mu\text{l}$  aliquotiert. Zur Bestimmung des exakten Titers wurden Verdünnungen von  $1 \times 10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-7}$  und  $1 \times 10^{-7}$  auf LB/Ampicillin-Nährböden ausplattiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Auszählen der koloniebildenden Einheiten wurde der Titer mit  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml bestimmt.

Zur Amplifikation wurden jeweils 50.000 CFU auf 160 großen LB/Ampicillin-Nährböden (Durchmesser: 150 mm) ausplattiert. Dies entsprach mit einer Gesamtzahl von  $8 \times 10^6$  CFU dem 2,3-fachen der Anzahl der unabhängigen Klone. Dazu wurden 53  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension in 32 ml LB/Ampicillin-Flüssigmedium aufgenommen und davon je 200  $\mu\text{l}$  pro Platte ausgestrichen. Das stellte sicher, daß alle Klone der Bibliothek amplifiziert wurden. Nach einer Inkubation von 48 h bei  $30^\circ\text{C}$  wurden die gewachsenen Kolonien mit 10 ml LB-Flüssigmedium je Platte überschichtet, für 15 min leicht geschüttelt und anschließend mit einem Zellschaber vom Agar vollständig gelöst. Die Zellsuspension wurde aufgenommen und jeweils drei Platten mit 10 ml frischem LB-Flüssigmedium nachgewaschen. Die Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von ca. 2,1 l wurde in 50 ml-Falcon-Röhrchen für 15 min bei 4000xg zentrifugiert, wobei jedes Röhrchen zweimal befüllt wurde. Die Lagerung der Pellets erfolgte bis zur Aufarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$ .

Die Plasmide wurden mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Giga Kit* isoliert. Dazu wurden die Bakterien in 250 ml Puffer *PI* aufgenommen. Aufgrund der hohen Zelldichte wurde abweichend vom Herstellerprotokoll nach der ersten Zentrifugation der Überstand zusätzlich vakuumfiltriert, bevor die Lösung auf die Säulen gegeben wurde. Die cDNS wurde abschließend für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 2 ml Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) aufgenommen. Die Konzentration wurde mit  $0,97 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bestimmt ( $\text{OD}_{260/280}$ : 1,76). Die Ausbeute von rund 2 mg Bibliotheks-cDNS reichte für 16 große Hefetransformationen. Die cDNS wurde aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.8.3 Kleine Hefetransformation

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* AH109 erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Ito *et al.*, 1983). Die Hefen wurden über Nacht bei 30°C in 2 ml YPAD-Medium in 15 ml-*Falcon*-Röhrchen kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in einem 1 l-Erlenmeyer-Kolben in 50 ml YPAD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt. Dabei ist eine Kultur von 50 ml für fünf Transformationen ausreichend. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,5) wurde die Kultur für 5 min bei 2000xg und RT zentrifugiert, das Zellpellet einmal mit sterilem, deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml Lithiumacetat resuspendiert (100 mM LiAc, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

Zu 1,5 µg des jeweiligen Fusionskonstruktes (bei Koexpressionen insgesamt 3,0 µg) wurden in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß 18 µl Lachsspermien-Träger-DNS (10 mg/ml, Sigma) gegeben. Die Träger-DNS wurde zuvor durch Kochen für 40 s und sofortiges Kühlen auf Eis denaturiert. Zu jedem DNS-Ansatz kamen je 200 µl Zellsuspension und 1,2 ml Polyethylenglycol (40% PEG, 100 mM LiAC, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Die Ansätze wurden durch Invertieren gemischt, für 30 min bei 30°C und anschließend für 15 min bei 42°C inkubiert. Darauf wurden die Hefezellen durch kurze Zentrifugation sedimentiert und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Nach Transformation des Köderkonstruktes wurden die Zellen auf -Trp-Medium und nach Kotransformation von Köder- und Beutekonstrukt auf -Trp/-Leu-Medium ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für mindestens zwei Tage bei 30°C.

Hefen, die nur das Köderkonstrukt enthielten, wurden anschließend zum Animpfen von Vorkulturen der großen Hefetransformation verwendet. Die mit Köder- und Beutekonstrukten transformierten Hefeklone, wurden zum Nachweis möglicher Interaktionen auf -Trp/-Leu/-His/-Ade-Nährböden ausgestrichen und einem β-Galaktosidase-Aktivitätstest unterzogen.

### 2.8.4 Große Hefetransformation

Drei Vorkulturen mit jeweils 2 ml -Trp-Medium wurden mit je einer großen Hefekolonie, die bereits das Köderkonstrukt enthielt, in 15 ml-*Falcon*-Röhrchen angeimpft und bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte Vorkultur von 6 ml mit 150 ml -Trp-Medium verdünnt, auf zwölf 50 ml-*Falcon*-Röhrchen verteilt (12x 13 ml) und über Nacht bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Diese zweite Vorkultur wurde für 3 min bei 2000xg und RT zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml -Trp-Medium resuspendiert. Damit wurden 900 ml -Trp-Medium in einem 3 l-Erlenmeyer-kolben mit einer OD<sub>600</sub> von 0,15-0,25 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45-0,75 bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Hefekultur für 5 min bei 2000xg und RT in mehreren 50 ml-*Falcon*-Röhrchen parallel zentrifugiert, die Pellets mit insgesamt 300 ml sterilem, deionisiertem Wasser gewaschen, in 10 ml Wasser in einem *Falcon*-Röhrchen vereinigt und nach

erneutem Waschen mit 50 ml Lithiumacetat (100 mM LiAc, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) in 4 ml Lithiumacetat resuspendiert.

In drei parallelen Ansätzen wurden in 50 ml-*Falcon*-Röhrchen zu je 40 µg Bibliotheks-cDNS 145 µl denaturierte Lachsspermien-Träger-DNS (10 mg/ml, Sigma), 1,5 ml Zellsuspension und 8,6 ml Polyethylenglycol (40% PEG, 100 mM LiAC, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gegeben. Die Ansätze wurden gut durchmischt und für 30 min bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 1 ml DMSO (Sigma) wurden die Ansätze vorsichtig gemischt und für 15 min bei 42°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Ansätze für 2 min auf Eis gestellt und anschließend für 5 min bei 2000xg und RT zentrifugiert. Die Pellets wurden in jeweils 25 ml -Trp/-Leu-Medium resuspendiert, in einem 1 l-Erlenmeyer-Kolben vereinigt und für 1 h bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Die Hefezellen wurden abschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 2000xg und RT pelletiert und in 12 ml -Trp/-Leu-Medium resuspendiert. Davon wurden je 300 µl auf großen -Trp/-Leu/-His-Nährböden (150 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen bei 30°C wurden die gewachsenen Kolonien zweimal hintereinander auf -Trp/-Leu/-His/-Ade-Nährböden ausgestrichen und erneut 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Das zweite Ausstreichen erfolgte parallel auf zwei identischen Platten, von denen die eine für den β-Galaktosidase-Aktivitätstest und die andere für die Präparation der Beutekonstrukte verwendet wurde.

Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurden Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  des Transformationsansatzes auf -Trp/-Leu-Nährböden ausplattiert und nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 30°C die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Für das statistisch vollständige Durchmuster einer cDNS-Bibliothek sollte dabei die vierfache Zahl der unabhängigen Klone der jeweiligen cDNS-Bibliothek erreicht werden.

### 2.8.5 β-Galaktosidase-Aktivitätstest

Für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden Hefekolonien nach 2-3-tägigem Wachstum auf -Trp/-Leu/-His/-Ade-Nährböden mit X-Gal-Weichagar (0,5% Agarose, 500 mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0), 1% SDS, 2% X-Gal in DMF (beides Sigma)) überschichtet. Für kleine Agarplatten wurde ein Volumen von 10 ml und für große Platten eines von 30 ml verwendet. Dazu wurde die Agarose nach dem Schmelzen in der Mikrowelle in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 50°C eingestellt und SDS sowie X-Gal kurz vor Gebrauch hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für bis zu 12 h. Dabei wurde die Blaufärbung in regelmäßigen Abständen notiert.

### 2.8.6 Plasmidpräparation aus Hefe

Für die Präparation von Beutekonstrukten aus lacZ-positiven Hefen wurden einzelne Kolonien von -Trp/-Leu/-His/-Ade-Nährböden in 2 ml -Leu-Medium resuspendiert und für 24 h bei 30°C und



250 Upm in einem 15 ml-*Falcon*-Röhrchen inkubiert. Die Zellen wurden durch kurze Zentrifugation pelettiert, in jeweils 200 µl Hefe-Lysepuffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1, Phenol in TE-Puffer äquilibriert, Roth) und 100 µl säurebehandelter Glaskügelchen wurden die Hefezellen durch dreiminütiges „Vortexen“ aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10.000xg und RT wurde die wäßrige, obere Phase (ca. 135 µl) abgenommen, mit 15 µl einer 10% Natrium-Acetat-Lösung und 375 µl 100% Ethanol vermischt und die DNS durch Zentrifugation für 30 min bei 10.000xg und RT präzipitiert. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, bei 37°C für 30 min getrocknet und in 10 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) aufgenommen.

Für die Amplifikation der Beutekonstrukte wurden jeweils 2 µl DNS mit Hilfe der Elektroporation in *E.coli DH5α* (Invitrogen) transformiert. Die Präparation der Plasmide erfolgte aus 3 ml Übernachtskultur (LB/Kanamycin) mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Zur Identifikation identischer Beuten wurden jeweils 5 µl einer Plasmidpräparation mit der Restriktionsendonuklease *BglII* analytisch verdaut, die die Beutekonstrukte 5' und 3' der *Multiple Cloning Site* schneidet. Nach Auftrennung in einem Agarosegel gaben identische Fragmentgrößen einen Hinweis auf identische Beuten.

## 2.9 Zellkultur

Für die Kultur von *Flp-In-293*- (Invitrogen) und COS-7-Zellen wurde *DMEM* (*Dulbecco's Modification of Eagles Medium*, Invitrogen/Gibco) mit 4,5 g/l Glukose, *GlutaMax I* und Pyruvat, 10% fötalem Rinderserum (FCS, Biochrom) sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beides Sigma) verwendet. Das Medium für *Flp-In-293*-Zellen enthielt zusätzlich 100 µg/ml *Zeocin* (Invitrogen). Die Kultivierung erfolgte in T75-Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, *Cellstar*, Greiner Bio-One) in 15 ml Medium bei 37°C in 5% Kohlendioxid und 95% wasserdampfgesättigter Atmosphäre (*BBD 6220* Zellkulturschrank, Heraeus).

Alle Arbeiten wurden in einer sterilen Werkbank (*Hera Safe*, Heraeus) mit sterilen und auf 37°C vorgewärmten Lösungen durchgeführt. Die Kultivierungsmedien wurden alle zwei Tage gegen frische ausgetauscht. Bei einer Konfluenz >90% wurden die Zellen vereinzelt und in neue Kulturflaschen umgesetzt. Dazu wurden diese einmal mit 10 ml PBS-Puffer ohne Magnesium und Kalzium (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, Invitrogen/Gibco) gewaschen und durch Inkubation für 30-60 s in 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) bei RT vom Boden abgelöst. Die Trypsin-Inkubation wurde durch Zugabe von 8 ml Kultivierungsmedium gestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 500xg und RT sedimentiert, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (*CASY*, Schärfe System) bestimmt. Abschließend wurden 0,5-1,0x10<sup>6</sup> Zellen in neue Kulturflaschen ausgesät. Die verwendeten Zelllinien

wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination untersucht (*VenorGeM Mycoplasma Detection Kit*, Minerva Biolab).

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte mit Hilfe von *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) in serumfreiem *Opti-MEM*-Medium mit *GlutaMax I* (Invitrogen/Gibco) ohne Antibiotika.

## 2.10 Proteinbiochemische Methoden

### 2.10.1 Koimmunpräzipitation

Für die Koimmunpräzipitation von Golgin-160 mit dem C-Terminus von ROMK wurden Lysate von transient transfizierten Säugerzellen verwendet. Dazu wurden  $15 \times 10^6$  Flp-In-293-Zellen (Invitrogen) in T175-Zellkulturschalen (175 cm<sup>2</sup>, *Cellstar*, Greiner Bio-One) in 30 ml Kulturmedium ohne Antibiotika ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer ohne Magnesium und Kalzium (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, Invitrogen/Gibco) gewaschen und das Medium gegen serumfreies *Opti-MEM* (Invitrogen/Gibco) ausgetauscht. Mit Hilfe von *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) wurden die Zellen mit (1) 27 µg hROMK(167-391) / pCMV-HA und 3 µg Golgin-160-FLAG / pcDNA3.1 Zeo(-), (2) 27 µg hROMK(167-391) / pCMV-HA und 3 µg pcDNA3.1 Zeo(-) (Leervektor) und (3) 27 µg pCMV-HA (Leervektor) und 3 µg Golgin-160-FLAG / pcDNA3.1 Zeo(-) transfiziert. Nach einer Inkubation von 12 h im Brutschrank wurde das serumfreie Medium gegen das Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 12 h inkubiert.

Zur Herstellung der Zellysate wurden die Kulturschalen für 10 min auf Eis gestellt, die Zellen zweimal mit 20 ml eiskaltem TBS (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 7,4) mit Protease-Inhibitor (Roche) gewaschen und in 5 ml TBS-Puffer mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 400xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 2 ml TBS aufgenommen und die Zellen durch Ultraschall (dreimal 5 s) auf Eis aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 16.000xg und 4°C abgetrennt und der Überstand für die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die Expression der heterolog exprimierten Proteine hROMK(167-391)-HA und hGolgin-160-FLAG wurde in einem Vorversuch durch Western-Transferanalyse (Western-Blot) nachgewiesen.

Für die Immunpräzipitation wurden Anti-HA- und Anti-FLAG-Antikörper verwendet, die kovalent an die Oberfläche von roten Agarosegelkügelchen gebunden waren. (*EZviewTMRed ANTI-HA Affinity Gel* und *EZviewTMRed ANTI-FLAG M2 Affinity Gel*, Sigma). Vorteile dieser Methode sind (1) eine stabile Bindung zwischen Antikörper und Gelkügelchen, (2) die Vermeidung unspezifischer Interaktionen zwischen dem üblicherweise verwendeten Protein A und Zellproteinen im Lysat und (3) das bessere Erkennen der farbigen Gelkügelchen bei den einzelnen Wasch- und Pelletierschritten.

Das Lysat, das sowohl ROMK(167-391)-HA als auch Golgin-160-FLAG enthielt, wurde geteilt und parallel mit Anti-HA- und mit Anti-FLAG-Antisera inkubiert. Als Kontrollen wurde das Zellysat mit ROMK(167-391)-HA mit Anti-FLAG und das Lysat mit Golgin-160-FLAG mit Anti-HA inkubiert. Dazu wurden für jeden Ansatz 40 µl der Gelkugeln-Suspension zweimal mit 500 µl eiskaltem TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen (Zentrifugation für 30 s bei 9500xg und 4°C) und mit 1 ml Zellysat derselben Proteinkonzentration über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert.

Die Gelkugeln wurden durch Zentrifugation für 30 s bei 8200xg und 4°C sedimentiert und dreimal für jeweils 5 min mit 500 µl eiskaltem TBS bei 4°C rotierend gewaschen. Zur Ablösung des Antigens vom Antikörper wurden die Pellets mit je 30 µl 2x Probenpuffer (*NuPAGE*, Invitrogen) für 5 min bei 95°C inkubiert, vorsichtig durchmischt und für 30 s bei 8.200xg zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und nachfolgenden Western-Blot immunbiochemisch analysiert. Hierzu wurden die Proben, die mit Anti-FLAG-Antikörpern immunpräzipitiert wurden mit Anti-ROMK-Antikörpern (Alomone Labs) und diejenigen, die mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert wurden, mit Anti-FLAG-Antikörpern (Sigma) analysiert.

### 2.10.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte als vertikale Flachbett-Elektrophorese in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit Sammel- und Trenngel nach dem Prinzip von Laemmli (1970). Dazu wurden Bis/Tris-HCl-Gradienten-Minigele (*NuPAGE*, Invitrogen) mit einer Acrylamidkonzentration von 4-12% und einer Stärke von 1 mm verwendet. Für eine gute Auftrennung von Proteinen mit einer Größe zwischen 14 und 200 kDa wurde als Laufpuffer MOPS-Puffer (*NuPAGE Mops SDS Running Buffer*, Invitrogen) eingesetzt. Die Proben wurden in Probenpuffer (*NuPAGE*, Invitrogen) inkl. 5% β-Mercaptoethanol (Sigma) für 5 min bei 95°C denaturiert und für 60-90 min bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden 2 µl eines fluoreszenzmarkierten Proteinstandards aufgetragen (10 bis 250 kDa, *Odyssey Protein Molecular Weight Marker*, LiCor)

### 2.10.3 Western-Transferanalyse (Western-Blot)

Die in einer SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrottransfer (*Novex XCell 2 Blotmodul*, Invitrogen) vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (*BioTrace NT*, Maschenweite 0,2 µm, Pall) übertragen. Gel und Membran wurden dabei als „Sandwich“ mit Filterpapieren und Schaumstoffschwämmen (beides Biorad) zwischen Kathode und Anode eingeklemmt. Gel, Membran, Filterpapiere und Schaumstoffschwämme wurden vor dem Transfer für

5 min in Transferpuffer (*NuPAGE*, Invitrogen) äquilibriert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 25 V mit kaltem Transferpuffer im Eisbad.

Zur Bestätigung eines erfolgreichen Transfers wurde das Acrylamidgel für 15 min in Coomassie-Färbelösung (0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250* (BioRad), 10% Essigsäure, 40% Ethanol) inkubiert und anschließend entfärbt (10% Essigsäure, 40% Ethanol). Bei vollständigem Transfer waren keine Proteinbanden mehr sichtbar. Die Nitrocellulosemembran wurde für 5 min in 0,1% *Ponceau*-Lösung (Sigma) inkubiert und anschließend mit Leitungswasser kurz entfärbt. Nach einem erfolgreichen Transfer war ein Bandenmuster sichtbar, dessen Färbung anschließend wieder ausgewaschen wurde.

Die Membran wurde für 1 h bei RT in Blockierpuffer (50% *Odyssey Blocking Buffer* (LiCor), 50% PBS (Gibco/Invitrogen), 0,05% *Tween20* (Sigma)) und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in Blockierpuffer verdünntem ersten Antikörper (Anti-FLAG aus Maus (Sigma) 1:5000, Anti-ROMK aus Kaninchen (Alomone Labs) 1:500) in einer Schale auf einem Kreisschüttler inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurden im Anschluß durch viermaliges Waschen für je 5 min mit TBST-Puffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% *Tween20* (Sigma), pH 7,4) entfernt.

Zum Nachweis der gebundenen ersten Antikörper wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem in Blockierpuffer verdünnten, fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (*Alexa Fluor 680* Anti-Maus aus Ziege, *Alexa Fluor 680* Anti-Kaninchen aus Ziege (Molecular Probes) 1:2500) lichtgeschützt in 50 ml-*Falcon*-Röhrchen auf einem Rolleninkubator inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden erneut durch viermaliges Waschen für je 5 min mit TBST entfernt. Die Transfer-Membran wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (*Odyssey Imaging System*, LiCor Biosciences) ausgewertet.

## 2.11 Immunfluoreszenz

Die subzelluläre Lokalisation von ROMK und Golgin-160 wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz in transient transfizierten Säugerzellen untersucht. Dazu wurden auf sterilen Deckgläschen (Durchmesser: 12 mm, Menzel) in einer 24-Kavitäten-Platte (Cellstar, Greiner Bio-One)  $1 \times 10^5$  COS-7-Zellen in 1 ml Kulturmedium je Kavität ohne Antibiotikum ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer ohne Magnesium und Kalzium (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, Invitrogen/Gibco) gewaschen und das Medium gegen 0,5 ml serumfreies *Opti-MEM* (Invitrogen/Gibco) ausgetauscht. Mit Hilfe von *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) wurden die Zellen mit (1) 1,6 µg hROMK2 / pcDNA3 und 0,8 µg hGolgin-160-FLAG / pcDNA3.1 Zeo(-), (2) 1,6 µg pcDNA3 (Leervektor) und 0,8 µg hGolgin-160-FLAG / pcDNA3.1 Zeo(-), (3) 1,6 µg hROMK2 / pcDNA3 und 0,8 µg pcDNA3.1 Zeo(-) (Leervektor), (4) 0,8 µg hROMK1 / pEGFP-C1 und (5) Wasser transfiziert. Nach einer Inkubation von 12 h im Brutschrank wurde das serumfreie Medium gegen das Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h inkubiert.

Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C in Mikrotubuli-stabilisierendem Puffer (MTSP, 80 mM Na-Pipes (Sigma), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck), 1 mM Na-EGTA (Sigma), 4% (v/v) Polyethylenglykol 6000 (Merck), pH 6,9) inkubiert, anschließend für 20 min mit 4% Paraformaldehyd (Sigma) in MTSP bei 4°C fixiert und mit 1% Triton X-100 (BioRad) in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei RT mit 5% Rinderserum (Sigma) und 3% Pferdeserum (Sigma) in PBS blockiert, dreimal kurz mit PBS gewaschen und dann für 1 h bei RT mit Anti-ROMK-Antiserum aus Kaninchen (1:100, Alomone Labs) und Anti-FLAG-Antikörpern aus Maus (1:1000, Sigma) inkubiert. Die primären Antikörper wurden in PBS mit 3% Pferdeserum (Sigma) verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den sekundären Antikörpern *Alexa Fluor 546* Anti-Kaninchen aus Ziege und *Alexa Fluor 488* Anti-Maus aus Ziege (beides 1:1000, Molecular Probes) inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden in PBS mit 3% Rinderserum (Sigma) verdünnt. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Salze wurden durch zweimaliges Waschen mit deionisiertem Wasser entfernt. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf Objektträgern (Super Frost 76x26x1 mm, Menzel) in einem Tropfen *Permafluor*-Lösung (Immunotech) eingebettet und über Nacht bei 4°C getrocknet. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen nur mit den zweiten Antikörpern inkubiert. Zellen, die das EGFP-markierte ROMK-Protein exprimierten, blieben unbehandelt und wurden lediglich gewaschen und eingebettet.

Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (*TCS SP2*, Leica) bei Anregungswellenlängen von 488 nm und 543 nm. Jeder Bildpunkt wurde zweimal detektiert und als Mittelwert dargestellt. Um eine Vergleichbarkeit der Abbildungen zu ermöglichen, wurden die Anregungsenergie und die Detektorempfindlichkeit von Experiment zu Experiment nicht verändert. Von jeder Zelle wurden zehn Bilder in unterschiedlichen Fokusebenen aufgezeichnet, von denen im Ergebnisteil nur jeweils eines gezeigt wird. Eine Summation über mehrere Fokusebenen ergab nur eine Abnahme der Bildschärfe, aber keine Zunahme an Information.

## 2.12 Elektrophysiologische Methoden

Der Gesamtstrom durch Ionenkanäle in der Oozytenmembran kann in Abhängigkeit vom Membranpotential mit Hilfe der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme gemessen werden. Dabei wird durch eine Spannungselektrode im Oozyteninneren die Potentialdifferenz gegen eine Referenzelektrode im Bad bestimmt und mit Hilfe eines Rückkopplungsverstärkers und einer Stromelektrode ein vorgegebenes Membranpotential durch „Injektion“ von Ladung eingestellt. Gemessen wird der Strom, der „injiziert“ werden muß, um die Membran auf dem gewünschten Potential zu halten. Der zu einem gegebenen Zeitpunkt gemessene Strom entspricht bei Überexpression eines bestimmten Ionenkanals und der Verwendung geeigneter Versuchsbedingungen dem Ionenfluß durch diesen Kanal (Stühmer *et al.*, 1992).

### 2.12.1 Lösungen

Tabelle 7: Lösungen für elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten von *Xenopus laevis*

Substanz	OR-2	ND96	ND96 mit Antibiotikum
NaCl (Merck)	82,5 mM	96,0 mM	96,0 mM
KCl (Merck)	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM
CaCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (Merck)	-	1,8 mM	1,8 mM
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (Merck)	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM
HEPES (Sigma)	5,0 mM	5,0 mM	5,0 mM
Natriumpyruvat (Sigma)	-	-	2,5 mM
Theophyllin (Sigma)	-	-	90 µg/ml
Gentamicin (Sigma)	-	-	50 µg/ml

Die Lösungen wurden auf pH 7,5 eingestellt, nach der Herstellung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

### 2.12.2 Oozytenpräparation

Zur Entnahme von Oozyten wurde ein weiblicher Krallenfrosch der Spezies *Xenopus laevis* für ca. 15 min in 0,1% Tricain-Lösung (Sigma) anästhesiert. Unter semisterilen Bedingungen wurde mit einem ca. 1 cm langen Schnitt der Bauchraum eröffnet und durch diesen Zugang Ovarialsäcke entnommen. Diese wurden in OR-2 mit Pinzette und Schere zerteilt, mehrmals mit OR-2-Lösung gewaschen, für 120-150 min in Kollagenase-OR-2-Lösung (2 mg/ml, Worthington Biochemical) bei 18°C unter leichtem Schütteln inkubiert und abschließend mehrmals mit ND96 gewaschen. Die Lagerung erfolgte in ND96 mit Antibiotikum bei 18°C unter leichtem Schütteln. Diese Arbeiten wurden von Stefan Müller und Andreas Hertler im Labor von Carsten Strübing durchgeführt. Aus dem Gemisch der präparierten Oozyten unterschiedlicher Wachstums- und Reifestadien wurden die vollausgewachsenen und unbeschädigten Oozyten des Reifestadiums VI aussortiert (Dascal, 1987) und für die Injektion mit cRNS eingesetzt.

### 2.12.3 Injektion von cRNS

Injektionskapillaren wurden mit Hilfe des *DMZ-Universal Mikroelektrodenpullers* (Zeitz-Instrumente) aus Borosilikatglas (Durchmesser: 1,2 mm, World Precisions Instruments) mit einer langen Spitze hergestellt. Ein Teil der Spitze wurde anschließend bis zu einem Durchmesser von 10-15 µm abgebrochen und mit einem Heizdraht kanülenförmig ausgezogen. Nachdem die Injektionskapillare mit Paraffinöl (Sigma,  $\rho = 0,88$  g/ml) gefüllt worden war, wurden mit Hilfe eines Nanoliterinjektors (World Precisions Instruments) ca. 3 µl cRNS aufgezogen und jede Oozyte mit 50 nl cRNS-Lösung injiziert. Folgende Mengen an cRNS wurden einzeln oder zusammen injiziert (ng cRNS/Oozyte): hROMK2: 0,05; rROMK1-HA: 0,50; hROMK2-Mutanten (A198T, L220F, A306T,

R311W, Y314C, L320P, R324L, F325C, 362X, 368X ): 0,50; hKir2.1: 0,10/0,30; hKir2.1-PC: 0,5; hKir2.2: 0,30; hKir2.3: 1,0; hKir2.4: 1,0; hKv1.5: 0,16; hKv4.3: 0,10; HERG: 9,24; Golgin-160: 1,15/4,5/5,0; GM130: 5,0; hGRB2: 5,0; hGRB7: 0,50/5,0; hGRB10: 5,0; hSGK1 WT, hSGK1(S422D), hSGK1(T256A/S422A): 5,0; hPP2A B56 $\beta$ : 0,50/5,0; hNRF2: 5,0; hCDR62: 5,0; hC13orf22: 5,0; hTNRC5: 5,0; Kontroll-oocyten wurden mit 50 nl Wasser injiziert. Bis zur Messung wurden die Oocyten einzeln in einer 96-Kavitätenplatte in ND96 mit Antibiotikum bei 18°C inkubiert.

#### 2.12.4 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

In der vorliegenden Arbeit wurden Elektroden aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament (GC-150TF-15, Clarke Elektromedical Instruments) mit einem *DMZ-Universal Mikroelektrodenpullers* (Zeitz-Instrumente) hergestellt und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, in die ein chlorierter Silberdraht tauchte. Der Serienwiderstand betrug 0,3-1,3 M $\Omega$ . Die Elektroden wurden mittels Mikromanipulatoren (World Precision Instruments) bewegt und waren über *HS-2A*-Vorverstärker (Axon Instruments) mit einem *Turbo Tec 10CX* Rückkopplungsverstärker und einem *ITC-16* Signalwandler (beides NPI Instruments) verbunden. Für die Programmierung der Pulsprotokolle, die Steuerung des Rückkopplungsverstärkers sowie die Aufzeichnung und Auswertung der Daten wurde *Pulse* (HEKA Elektronik) verwendet.

Die Messungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Dabei wurden die Oocyten permanent mit ND96 perfundiert. Folgende Meßprotokolle wurden verwendet: ROMK: 500 ms Testpulse von -120 mV bis +40 mV in Schritten von 20 mV, beginnend bei einem Haltepotential von -80 mV und mit einem Zwischenintervall von 5 s. Kir2.1: 500 ms Testpulse von -160 mV bis 0 mV in Schritten von 20 mV, beginnend bei einem Haltepotential von -100 mV und mit einem Zwischenintervall von 5 s. HERG: 1 s Testpulse von -120 mV bis +80 mV in Schritten von 20 mV, beginnend bei einem Haltepotential von -80 mV und mit einem Zwischenintervall von 10 s. Kv1.5: 500 ms Testpulse von -100 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV, beginnend bei einem Haltepotential von -80 mV und mit einem Zwischenintervall von 5 s. Kv4.3: 1,5 s Testpulse von -80 mV bis +60 mV in Schritten von 20 mV, beginnend bei einem Haltepotential von -80 mV und mit einem Zwischenintervall von 10 s.

Strom-Spannungskurven von ROMK, Kir2.1, und Kv1.5 wurden je Oozyte einmal aufgezeichnet und die mittleren Stromamplituden für jedes Potential für das Zeitintervall zwischen 100 und 400 ms des Testpulses bestimmt. Die Strom-Spannungskurven von HERG und Kv4.3 wurden je Oozyte dreimal aufgezeichnet und daraus die mittleren *Tail*-Ströme von HERG im Moment des Potentialwechsels vom Testpuls zum Haltepotential bzw. die mittleren *Peak*-Stöme von Kv4.3 für jedes Potential berechnet. Die Datenanalyse wurde bei folgenden Potentialen durchgeführt: ROMK: 0 mV; Kir2.1: -160 mV; Kv1.5: +40 mV; Kv4.3: +40 mV; HERG: *Tail*-Strom nach einem Testpuls auf +40 mV. Die Daten wurden 12-84 h nach der Injektion der Oocyten mit 1000 Hz (HERG:

2000 Hz) aufgezeichnet und mit 500 Hz gefiltert. Alle Untersuchungen wurden mehrfach mit mindestens zwei unabhängigen Oozyten- und cRNS-Präparationen durchgeführt.

Die Koexpressionen mit den Kir2-Kanälen und den GRB-Adapterproteinen wurden von Guiscard Seeböhm am Physiologischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Dazu wurde folgendes Meßprotokoll verwendet: 500 ms Testpulse von -140 mV bis +40 mV in Schritten von 20 mV, beginnend bei einem Haltepotential von -100 mV und mit einem Zwischenintervall von 5 s. Die Datenanalyse erfolgte bei einem Potential von -80 mV.

Für pharmakologische Untersuchungen von ROMK und Kir2.1 wurden Oozyten mit 0,10/0,50/1,0/10 mM Bariumchlorid bzw. 0,1/0,5/1,0 mM Chinidin (beides Sigma) in ND96 bis zur maximalen Hemmung perfundiert. Anschließend wurde die Blockersubstanz ausgewaschen. Dabei wurde ein vereinfachtes Meßprotokoll verwendet, das aus Testpulsen vom Haltepotential auf 0 mV bei ROMK bzw. -160 mV bei Kir2.1 bestand. Die mittlere Inhibition sowie die halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) wurden aus den Daten von drei Oozyten je Konzentration berechnet.

### 2.13 Oberflächenexpressionsanalyse

Die Oberflächenexpression des extrazellulär an Position 115 mit einem HA-Antigenepitop markierten ROMK-Kanalproteins (rROMK1-HA) wurde in einzelnen *Xenopus* Oozyten gemessen (Zerangue *et al.*, 1999). Dazu wurden Oozyten mit 0,5 ng der Kanal-cRNS, 1,15 ng Golgin-160-cRNS oder mit beiden cRNS injiziert und für 48 h in ND96 bei 18°C inkubiert. Als Kontrollen dienten Oozyten, die mit 0,05 ng cRNS des ROMK-Wildtyps (hROMK2 WT) oder Wasser injiziert wurden. Um das Hintergrundsignal möglichst gering zu halten, wurden die Oozyten intensiv mit Collagenase verdaut und nur die unversehrten Oozyten mit einheitlicher Größe und Pigmentierung für die Untersuchungen verwendet. Es wurde besonders darauf geachtet, daß sich keine Follikelreste mehr auf der Oberfläche der Oozyten befinden.

Nach zweitägiger Inkubation wurden bei einem Teil der Oozyten die Stromamplituden mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht. Der andere Teil wurde für die Oberflächenexpressionsanalyse verwendet. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C in ND96 mit 1% BSA (Sigma) durchgeführt. Die Oozyten wurden für 30 min blockiert, für 60 min mit dem primären, monoklonalen Anti-HA-Antikörper aus Ratte (1:200, Roche) markiert, viermal für insgesamt 60 min gewaschen, für 60 min mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markierten Anti-Ratte-Antikörper aus Ziege (1:500, Amersham Biosciences) inkubiert und anschließend sechsmal für insgesamt 60 min gewaschen. Die letzten beiden Waschschrte wurden ohne BSA durchgeführt. Einzelne Oozyten wurden in eine weiße 96-Kavitätenplatte mit je 50 µl ND96 vorgelegt. Die Lumineszenz einzelner Oozyten wurde automatisch nach Zugabe von 200 µl *SuperSignal ELISA Stable Peroxidase Solution* (Pierce) und Inkubation für 1 min über ein Zeitintervall von 1 s in einem *LumiStar* Lumineszenzmeßgerät (BMG Labtech) detektiert. Als Maß für die Oberflächenexpression



wurde die Lumineszenz als relative Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) angegeben. Zum Umsetzen der Oozyten wurden abgeschnittene, gelbe Pipettierspitzen eingesetzt. Das Blockieren und Waschen erfolgte in 35 mm-Petrischalen mit einem Volumen von 5 ml. Für die Antikörperinkubation wurden 24-Kavitätenplatten und Volumina von je 1 ml verwendet.

Die Oberflächenexpression des extrazellulär an Position 119 mit einem Protein C (PC)-Epitop markierten Kir2.1-Kanals (hKir2.1-PC) wurde von Ioana Neagoe im Labor von Blanche Schwappach am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg untersucht. Dazu wurden die Oozyten mit 0,5 ng der Kanal-cRNS, 1,15 ng Golgin-160-cRNS oder beiden cRNS injiziert. Für die Markierung wurde der primäre, monoklonale HPC-Antikörper aus Maus (Roche) sowie der sekundäre HRP-markierte Anti-Maus-Antikörper aus Ziege (Jackson Immuno Research) verwendet. Aus einem Teil der injizierten Oozyten wurden Proteinextrakte hergestellt, die in einem Western-Blot unter Verwendung derselben Antikörper untersucht wurden.

## 2.14 Datenanalyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von *Pulse* (HEKA Elektronik), *Excel* (Microsoft) und *SigmaPlot* (Systat Software). Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die Anzahl der Experimente wurde mit „n“ angegeben. Meßergebnisse wurden mit dem gepaarten *t*-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei wurden Werte von  $P < 0,05$  als signifikant angesehen. Die Darstellung der *P*-Werte wurde wie folgt vorgenommen:  $P < 0,05$ : \*;  $P < 0,01$ : \*\*;  $P < 0,001$ : \*\*\*. Die halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) wurde mit Hilfe des sigmoidalen *Hill*-Modells  $f = y_0 + ax^b / (c^b + x^b)$  ohne Berücksichtigung der basalen Leitfähigkeiten berechnet.

### 3 Ergebnisse

Mit Hilfe von molekularbiologischen, proteinbiochemischen, zellbiologischen und elektrophysiologischen Methoden sollten in der vorliegenden Arbeit neue Proteine identifiziert und charakterisiert werden, die mit dem ROMK-Kanalprotein interagieren. Für die Identifizierung wurde ein modifiziertes Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet, bei dem anstelle eines monomeren ein tetrameres Köderprotein eingesetzt wurde. Der mögliche Vorteil dieser Modifikation ist die Nachahmung der homotetrameren Struktur des nativen ROMK-Kanals.

#### 3.1 Validierung des modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Das in dieser Arbeit verwendete modifizierte Hefe-Zwei-Hybrid-System setzte bislang nur die Arbeitsgruppe von Blanche Schwappach am Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg (ZMBH) für das Durchmustern von cDNS-Bibliotheken ein und es lagen noch keine umfangreichen Erfahrungen damit vor. Deshalb sollte zunächst die Tauglichkeit der Methode durch die Bestätigung einer bereits bekannten und beschriebenen Protein-Protein-Wechselwirkung validiert werden. Diese Vorexperimente sollten auch Aufschluß darüber geben, ob die Verwendung eines tetrameren Köderproteins vielleicht sogar auch Nachteile in sich birgt.

In einer früheren Studie konnten wir mit Hilfe des klassischen, monomeren Systems nachweisen, daß der C-Terminus der Kationkanäle HCN2 und HCN4 (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Cation Channel*) an den C-Terminus der regulatorischen Kanaluntereinheit KCNE2 (*MinK-related Peptides 1*, MiRP1) bindet, und daß dadurch die biophysikalischen Eigenschaften des heteromeren Kanalproteins verändert werden (Decher *et al.*, 2003). Für die verwandten KCNE-Untereinheiten, KCNE1 (MinK), KCNE3 (MiRP2), und KCNE4 (MiRP3) konnten wir keine Bindung zeigen; auch die Koexpression mit den HCN2- und HCN4-Kanaluntereinheiten hatte keine funktionellen Änderungen der Ströme zur Folge.

Um diese funktionelle Wechselwirkung mit dem modifizierten System zu bestätigen, wurden die C-Termini von hHCN2 (AS 468-889) und hHCN4 (AS 519-1203) sowohl als monomere, als auch als tetramere Fusionsproteine mit der GAL4-DNS-Bindedomäne kloniert. Die Fusionsprotein-konstrukte des modifizierten Systems kodierten zusätzlich für eine Leucinzipperdomäne, die eine Tetramerisierung des Fusionsproteins bewirkt (Harbury *et al.*, 1993; Zerangue *et al.*, 2001). Diese Konstrukte wurden dann zusammen mit den C-Termini von hKCNE1 (AS 67-129), hKCNE2 (AS 73-123), hKCNE3 (AS 81-103) und mKCNE4 (AS 59-170), die als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne kloniert waren, in Hefezellen exprimiert.

Nach Kotransformation der verschiedenen Kombinationen von HCN- und KCNE-Konstrukten in den Hefestamm AH109 wurde die Anwesenheit beider Konstrukte sowie die Interaktion der Köder- und Beute-Fusionsproteine durch Wachstum auf selektiven Kulturmedien detektiert. Durch das Wachstum von Hefekolonien auf Medium ohne Tryptophan und Leucin (-Trp/-Leu) konnten die beiden transformierten Konstrukte nachgewiesen werden (Abb. 4A, C). Durch Wachstum auf einem Medium, welches zusätzlich kein Histidin enthielt (-Trp/-Leu/-His), konnte die Aktivierung des HIS3-Reportergens nachgewiesen und damit gezeigt werden, daß der C-Terminus von KCNE2 sowohl mit den monomeren C-Termini von HCN2 und HCN4 (Abb. 4B) (Decher *et al.*, 2003) als auch mit den tetrameren Köderproteinen interagiert (Abb. 4D). Mit dem klassischen und dem modifizierten System konnte jeweils nur die Bindung der Kanalproteine mit der KCNE2-Untereinheit, nicht aber mit den anderen KCNE-Untereinheiten gezeigt werden.

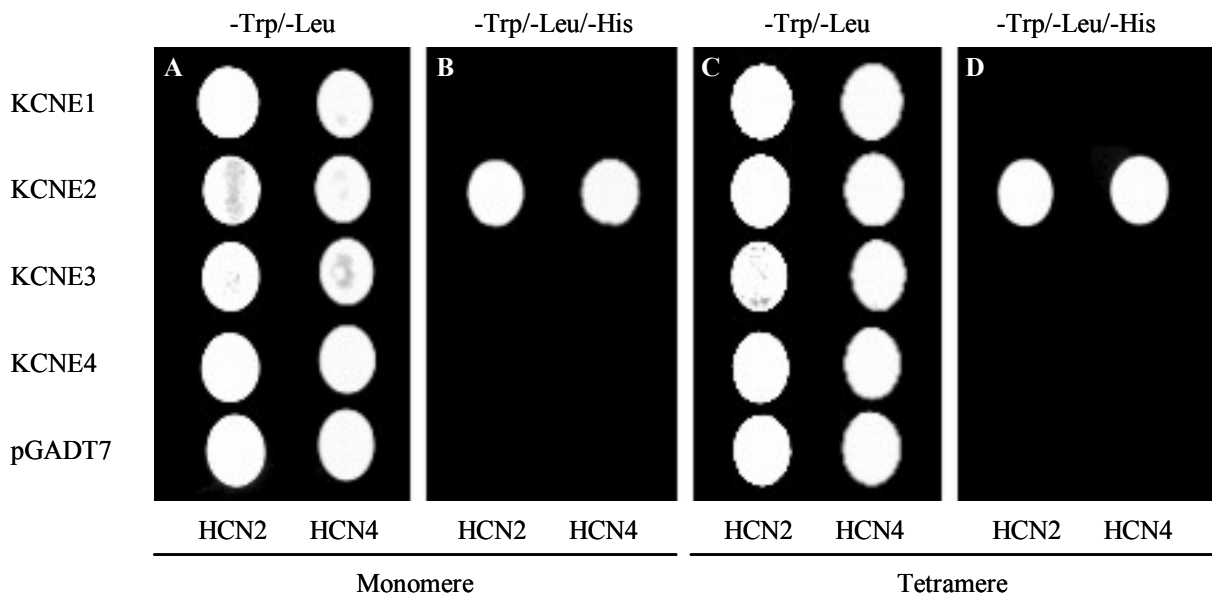


Abbildung 4: Interaktionen zwischen den C-Termini von KCNE1-4 und HCN2 bzw. HCN4. Der C-Terminus von KCNE2 interagiert mit den mono- und tetrameren C-Termini der HCN2- und HCN4-Kanäle in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay. Die C-Termini von KCNE1-4 wurden mit der Aktivierungsdomäne, die C-Termini von HCN2 und HCN4 wurden als Monomere (A, B) mit der DNS-Bindedomäne bzw. als Tetramere (C, D) mit der Leucinzipper- und der DNS-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Die Anwesenheit der Plasmide wurde durch das Wachstum des kotransformierten Hefestammes AH109 bei 30°C für 4 bis 7 Tage auf selektivem Medium (-Trp/-Leu) nachgewiesen (A, C). Die Interaktion zwischen den Fusionsproteinen wurde durch die Aktivierung des HIS3-Reportergens auf selektivem Medium (-Trp/-Leu/-His) gezeigt (B, D). Der leere pGADT7-Vektor wurde als Negativkontrolle verwendet.

In mehreren Kontrollexperimenten konnte die Spezifität der Bindung gezeigt werden. So wurde kein Wachstum der Hefen beobachtet, wenn die Hefezellen (1) mit jedem einzelnen Konstrukt oder leerem Vektor transformiert wurden (ohne Abbildung), (2) mit dem leeren DNS-Bindeprotein-Plasmid pGADT7 und den HCN2- oder HCN4-Konstrukten kotransformiert wurden (Abb. 4), (3) mit dem leeren DNS-Aktivierungsdomänen-Plasmid pGBKT7 und jedem KCNE-Konstrukt kotransformiert wurden (ohne Abbildung), oder (4) mit einem Fusionskonstrukt aus DNS-

Bindedomäne, Leucinzipperdomäne, sowie EGFP und jedem KCNE-Konstrukt kotransformiert wurden (ohne Abbildung).

Die ursprünglich mit der klassischen Methode nachgewiesene Bindung von HCN2 bzw. HCN4 an die KCNE2-Kanaluntereinheit konnte mit der modifizierten Variante des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems reproduziert werden. Die tetramere Konfiguration der verwendeten Köderproteine hatte somit auch keinen störenden Einfluß auf diese Wechselwirkung. Ebenso wurden keine falschpositiven Interaktionen mit den anderen KCNE-Untereinheiten beobachtet, die z.B. durch eine unspezifische Bindung derselben mit der Leucinzipperdomäne hätten verursacht werden können.

Es wurde daher davon ausgegangen, daß die Verwendung eines tetrameren Köderproteins für die Suche nach neuen Interaktionspartnern des ROMK-Kanalproteins geeignet ist, und daß sich aufgrund der nativen Struktur des Köderproteins neue assoziierte Proteine des Kanals finden lassen können.

### **3.2 Suche nach neuen Interaktionspartnern des ROMK-Kanalproteins mit Hilfe des modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems**

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von ROMK wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Assay (Fields & Song, 1989) unter Verwendung des *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3* (BD Biosciences Clontech) durchgeführt. Als Köder diente der rROMK-C-Terminus (AS 167-391), der als Fusionsprotein mit einer Leucinzipperdomäne exprimiert wurde. Der Leucinzipper verursacht eine Tetramerisierung des Köderproteins und imitiert somit die tetramere Zusammenstellung des nativen ROMK-Kanalproteins (Harbury *et al.*, 1993; Zerangue *et al.*, 2001). Zwei humane Nieren-cDNS-Bibliotheken (BD Biosciences Clontech) wurden auf Interaktionspartner hin durchgemustert. Bei der ersten Bibliothek (HL4005AB) wurde aufgrund einer hohen Transformationseffizienz ( $8 \times 10^6$  koloniebildende Einheiten je Transformation) bereits nach zweimaliger Transformation die vierfache Zahl der unabhängigen Klone erreicht und damit die Bibliothek statistisch vollständig durchgemustert. Bei der zweiten Bibliothek (HL4043AH) war die Effizienz deutlich geringer (durchschnittlich  $1,5 \times 10^6$  koloniebildende Einheiten je Transformation). Diese war daher erst nach zehnmaliger Transformation vollständig durchgemustert.

Insgesamt wurden 25 Proteinfragmente identifiziert, die mit dem ROMK-C-Terminus interagierten. Nach Isolierung der Beutekonstrukte aus den Hefezellen und nach erneuter Kotransformation mit dem Köderkonstrukt zeigten die Hefekolonien durch Wachstum auf den unterschiedlichen, selektiven Medien und durch Blaufärbung der Hefekolonien im  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest die Aktivierung aller drei Reportergene an. Eine Blaufärbung wurde auch bei der

Verwendung der humanen ROMK-Proteinsequenz beobachtet, die sich im C-Terminus in zehn Aminosäuren von der Rattensequenz unterscheidet. In mehreren Kontrollexperimenten konnte keine Aktivierung der Reportergene beobachtet werden, bei denen die Hefezellen (1) mit jedem einzelnen Konstrukt oder leerem Vektor transformiert wurden, (2) mit dem leeren DNS-Aktivierungsdomänen-Plasmid pGADT7 und dem ROMK-Köderkonstrukt kotransformiert wurden, (3) mit dem leeren DNS-Bindeprotein-Plasmid pGBKT7 und jedem Beutekonstrukt kotransformiert wurden, oder (4) mit einem Fusionskonstrukt aus EGFP, Leucinzipper- und DNS-Bindedomäne sowie jedem Beutekonstrukt kotransformiert wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8 exemplarisch für das gefundene Beutekonstrukt Golgin-160(614-849) dargestellt.

Tabelle 8: Exemplarisches Ergebnis des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays für Golgin-160(614-849)

Plasmide	Selektive Medien mit aufsteigende Stringenz		
	-Trp/-Leu	-Trp/-Leu/-His/-Ade	-Trp/-Leu/-His/-Ade+X-Gal
pGBKT7 (Leervektor) + pGADT7 (Leervektor)	+	-	-
Golgin-160(614-849) / pGAD10	-	-	-
Golgin-160(614-849) / pGAD10 + pGBKT7 (Leervektor)	+	-	-
rROMK(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7	-	-	-
rROMK(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7 + pGADT7 (Leervektor)	+	-	-
rROMK(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7 + Golgin-160(614-849) / pGAD10	+	+	blau*
hROMK(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7 + Golgin-160(614-849) / pGAD10	+	+	blau*
EGFP-Leucinzipper / pGBKT7	-	-	-
EGFP-Leucinzipper / pGBKT7 + pGADT7 (Leervektor)	+	-	-
EGFP-Leucinzipper / pGBKT7 + Golgin-160(614-849) / pGAD10	+	-	-

-Trp/-Leu/-His/-Ade = selektive Medien ohne Tryptophan, Leucin, Histidin, Adenin

+/- = Wachstum / kein Wachstum auf selektiven Medien

\*  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest

Die gefundenen 25 Proteine wurden anhand von Literatur- und Datenbankrecherchen näher beschrieben (siehe Abschnitt 3.3) und entsprechend ihrer bekannten Funktion in folgende Gruppen eingeteilt: Proteintrafficking (3), Proteasom (1), Signaltransduktion (4), Transkription (6), Translation (1), Zellproliferation (3), Metabolismus (1) und Zelladhäsion (1). Bei fünf Proteinen war die Funktion nicht aufgeklärt worden (Abb. 5). In Tabelle 9 sind alle 25 Interaktionspartner im Einzelnen mit Protein- und Gennamen sowie Zugangsnummer (*Accession Number*) für *GenBank* aufgeführt.

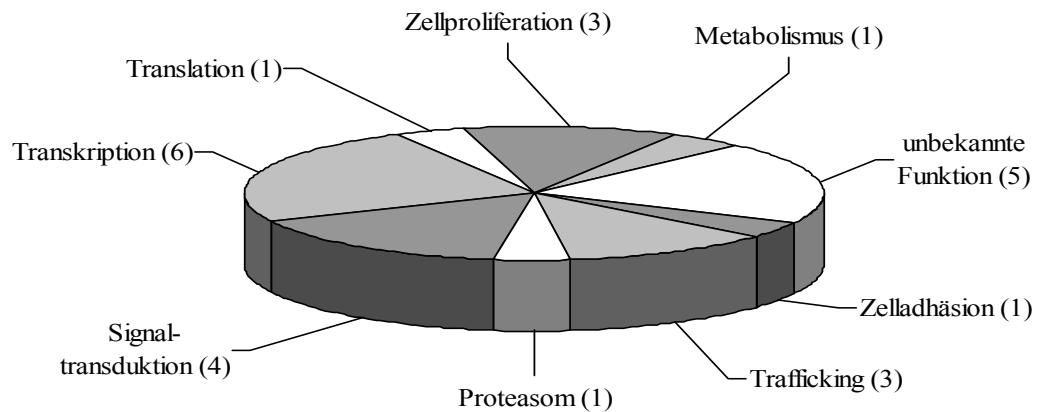


Abbildung 5: Funktionelle Klassifizierung der gefundenen Interaktionspartner von ROMK (Anzahl in Klammern) auf Grundlage von Literatur- und Datenbankrecherchen.

Tabelle 9: Gefundene Interaktionspartner von ROMK

Funktion	Nr.	Bezeichnung	Gensymbol	GenBank*
Trafficking	1	Golgi Autoantigen, Golgin-Unterfamilie A3	<i>GOLGA3</i>	NM_005895
	2	Kinectin 1	<i>KTN1</i>	NM_004986
	3	Carnitine palmitoyltransferase 2	<i>CPT2</i>	NM_000098
Signaltransduktion	4	Protein Phosphatase 2A B-Untereinheit 56β	<i>PPP2R5B</i>	NM_006244
	5	Growth factor receptor bound protein 7	<i>GRB7</i>	NM_005310
	6	Signal transducer and activator of transcription 3	<i>STAT3</i>	NM_003150
	7	Fasciculation and elongation protein zeta 2	<i>FEZ2</i>	NM_005102
Transkription	8	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	<i>NFE2L2</i>	NM_006164
	9	Cerebellar degeneration-related 2	<i>CDR2</i>	NM_001802
	10	Pre-B-cell leukemia transcript. factor interact. p.1	<i>PBXIP1</i>	NM_020524
	11	MBD2 interacting zinc finger protein	<i>MIZF</i>	NM_015517
	12	Truncated zinc finger protein (Myoneurin)	<i>MYNN</i>	NM_018657
	13	cAMP-dependent transcription factor 5	<i>ATF5</i>	NM_012068
Zellproliferation	14	Matrix associated regulator of chromatin, B1	<i>SMARCB1</i>	NM_003073
	15	Chaperonin containing t-complex polypeptide s.7	<i>CCT7</i>	NM_006429
	16	Insulin-like growth factor binding protein 7	<i>IGFBP7</i>	NM_001553
Metabolismus	17	Dihydropyrimidinase	<i>DPYS</i>	NM_001385
Translation	18	Mitochondrial ribosomal protein S9	<i>MRPS9</i>	NM_182640
Proteasom	19	26S Protease regulatory subunit	<i>PSMC1</i>	NM_002802
Zelladhäsion	20	Catenin (cadherin-associated protein) alpha 1	<i>CTNNA1</i>	NM_001903
unbekannt	21	Upstream of NRAS (NRAS- related protein)	<i>UNR</i>	NM_001007553
	22	Selenoprotein P, Plasma, 1	<i>SEPP1</i>	NM_005410
	23	Receptor-interacting factor 1	<i>RIFI</i>	NM_001006945
	24	Chromosome 13, open reading frame 22	<i>C13orf22</i>	NM_005800
	25	Trinucleotide repeat containing 5	<i>TNRC5</i>	NM_006586

\* Zugangsnummer (*Accession Number*) für *GenBank*

### 3.3 Charakterisierung ausgewählter Interaktionspartner anhand von Literaturangaben

Von den neu gefundenen 25 Proteinen wurden aufgrund der bekannten bzw. vermuteten Funktion sieben für weitere Untersuchungen ausgewählt. Diese Proteine sind in Tabelle 10 aufgeführt. Im Folgenden werden sie und die Gründe für ihre Auswahl näher beschrieben.

Tabelle 10: Für funktionelle Analysen ausgewählte Interaktionspartner von ROMK

Nr.	Gensymbol	Synonym*	Proteingröße		Beute	
			[AS]	[kDa]	Größe [AS]	Abschnitt [AS]
1	<i>GOLGA3</i>	Golgin-160	1498	160	236	K614 - K849
2	<i>PPP2R5B</i>	PP2A B56β	497	56	470	V28 - S497
3	<i>GRB7</i>	-	532	60	455	P78 - L532
4	<i>NFE2L2</i>	NRF2	605	66	375	K56 - L430
5	<i>CDR2</i>	CDR62	454	62	212	L121 - I332
6	<i>C13orf22</i>	-	1092	120	313	R780 - Y1092
7	<i>TNRC5</i>	-	278	31	221	E58 - L278

\* Im Folgenden werden (soweit vorhanden) die Synonyme verwendet.

#### 3.3.1 Golgin-160

Das zuerst isolierte cDNS-Beutekonstrukt enthielt ein 708 bp großes Fragment von *GOLGA3* (Golgi Autoantigen, Golgin-Unterfamilie A3), welches für einen 236 AS großen Abschnitt (K614-K849) von Golgin-160 kodiert (Abb. 6). Golgin-160 wurde zunächst als Autoantigen beschrieben. Es hat eine Größe von 160 kDa und besitzt eine ubiquitäre Gewebsverteilung (Fritzler *et al.*, 1993; *Ascenta, Gene Logic*). Golgin-160 ist ein peripheres Golgi-Protein (Golgin), das an der zytoplasmatischen Seite der *cis*-Golgi-Matrix lokalisiert ist (Misumi *et al.*, 1997; Kim, 2003). Es liegt in phosphorylierter und dephosphorylierter Form vor, wobei die dephosphorylierte Form fester mit der Golgi-Membran assoziiert ist. Golgin-160 besitzt eine für Golgine charakteristische Coiled-coil Stielstruktur, die für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist, sowie ein kurzes, C-terminales Endstück und eine N-terminale Kopfdomäne (Abb. 6). Die Kopfdomäne weist mehrere putative Proteinbindestellen, regulatorische Sequenzmotive und Phosphorylierungsstellen auf (Misumi *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 2004). Ein kleiner Bereich dieser Domäne (AS 140-257) beinhaltet drei *Targeting*-Signale, die Informationen für die Golgi-Lokalisation, den Kernimport und die Kernretention enthalten. Die beiden zuletzt genannten Signale sind beim „volle Länge“ Protein maskiert (Hicks & Machamer, 2002). Das zugrundeliegende Gen, *GOLGA3*, kodiert für mehrere alternativ gespleißte Transkripte, die sich in ihrer extremen C-terminalen Sequenz unterscheiden. Die Golgin-160-cDNS kodiert für ein 1498 Aminosäuren (160 kDa) großes Protein (Hicks & Machamer, 2002).

Mancini und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, daß Golgin-160 während des programmierten Zelltods (Apoptose) ein Substrat von Caspase-2 und Caspase-3 ist (Schnittstellen sind Asp59, Asp139, und Asp31). Diese MLK3 abhängige (*Mixed-Lineage-Kinase-3*) Zerteilung der Kopfdomäne während der Apoptose führt zu einer Demaskierung der Kernimport- und Kernretentionssignale, was eine Voraussetzung für die Auflösung der Golgi-Struktur ist (Cha *et al.*, 2004). Dies ließ darauf schließen, daß Golgin-160 für die Zusammensetzung und Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur notwendig ist.

Die vermutete Tertiärstruktur von Golgin-160 (Kopf-Stiel-Endstück) besitzt Ähnlichkeit zu der des Golgi-Proteins p115 (Waters *et al.*, 1992; Sapperstein *et al.*, 1995), zu der des Membran-Mikrotubuli-Kupplungsproteins CLIP-170 (Rickard & Kreis, 1996) sowie der des Motorproteins Kinesin (Hirokawa & Takemura, 2004), die alle am Vesikeltransport beteiligt sind. Deshalb kann für Golgin-160 eine ähnliche Funktion vermutet werden. Hinweise auf eine weitere mögliche Funktion von Golgin-160 lieferte die Entdeckung, daß die N-terminale Kopfdomäne von Golgin-160 mit einem weiteren Golgin, dem 16 kDa großen GCP16 (*Golgi Complex-associated Protein 16*) interagiert. GCP16 wird durch Acetylierung mit Palmitin in der Golgi-Membran verankert und hemmt bei Überexpression in der acetylierten Form in Säugerzellen den Transport des viralen Glycoproteins VSV-G an die Zelloberfläche (Ohta *et al.*, 2003).

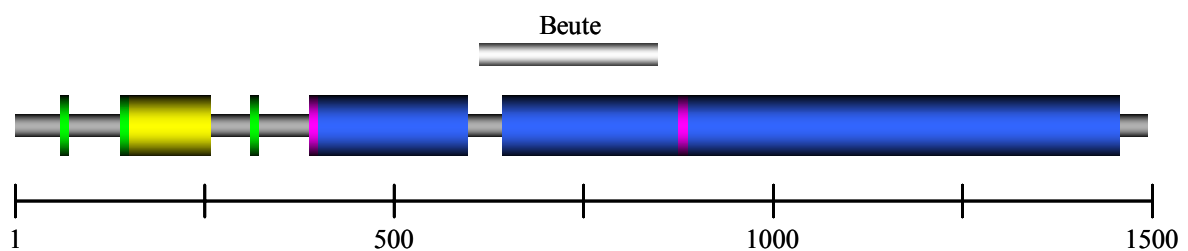








Abbildung 6: Topologie von Golgin-160. Golgin-160 besitzt eine Größe von 160 kDa (1498 AS) und gliedert sich in eine Kopf- (AS 1-393), Coiled-coil- (AS 394-597/645-1459) und End-Domäne (AS 1460-1498). Die Kopfdomäne enthält Targeting Signale für die Golgi-Lokalisation, den Kernimport und die Kernretention, sowie Caspase-Schnittstellen. An den Positionen S389 und S878 wurden putative Konsensussequenzen der humanen SGK1 identifiziert. Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 236 Aminosäuren.

-  Golgin-160-Proteinsequenz (1-1498)
-  Coiled-coil-Domäne (394-597/645-1459)
-  Caspase-Schnittstellen (D59/D139/D311)
-  Targeting-Domänen (140-257)
-  SGK1 Konsensus Stellen (S389/S878)
-  Hefe-Zwei-Hybrid-Beute (614-849)

Zusätzliche Hinweise lieferten Untersuchungen zum Hefehomolog GRP1 (*Golgin-160-Related Protein*), das an der späten Phase des Vesikeltransports vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat beteiligt ist (Kim *et al.*, 1999). Erste Hinweise für eine Rolle von Golgin-160 beim Transport von Ionenkanälen ergaben sich aus der Feststellung, daß das Golgi-Protein GM130 (Fritzler *et al.*, 1993) mit dem HERG (*Human Ether-a-go-go-Related Gene*)-Kaliumkanalprotein interagiert



und dadurch den durch HERG vermittelten Kaliumstrom erniedrigt (Roti Roti *et al.*, 2002). Die vermutete Rolle von Golgin-160 und der mit ihm assoziierten Golgi-Proteine am Vesikeltransport hat uns bewogen, die Interaktion dieses Proteins mit dem ROMK-Kanal näher zu untersuchen.

### 3.3.2 PP2A B56 $\beta$

Eine weitere Beute-cDNS enthielt ein 1410 bp großes Fragment, das für einen 470 AS Abschnitt (V28-S497) von PP2A B56 $\beta$  (Protein Phosphatase 2A B-Untereinheit 56 $\beta$ , NM\_006244), kodiert. PP2A B56 $\beta$  ist eine 56 kDa (497 AS) große regulatorische Untereinheit der Serin/Threonin-Protein-Phosphatase PP2A und gehört zur B56 Familie. (McCright & Virshup, 1995; McCright *et al.*, 1996a). Dieses Protein kommt hauptsächlich im zentralen Nervensystem vor, wo es im Zytoplasma lokalisiert ist (*Ascenta, Gene Logic*). Die Protein-Phosphatase PP2A ist ein heterotrimerer Proteinkomplex bestehend aus einer 36 kDa katalytischen C-Untereinheit, einer 65 kDa strukturellen, regulatorischen A-Untereinheit und einer variablen B-Untereinheit, die die Substratspezifität, Lokalisation und vermutlich auch die katalytische Aktivität des Enzyms beeinflusst.

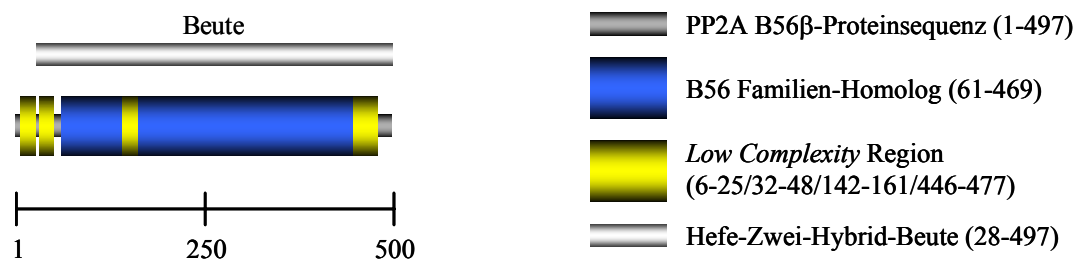


Abbildung 7: Topologie von PP2A B56 $\beta$ . PP2A B56 $\beta$  besitzt eine Größe von 56 kDa (497 AS) und gliedert sich in ein B56 Familien-Homolog, sowie vier *Low Complexity Region*. Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 470 Aminosäuren.

PP2A ist an einer Vielfalt von regulatorischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel an der Modulation von Membranrezeptoren, der Signaltransduktion, dem Metabolismus, der Regulation von Transkription, DNS-Replikation, sowie der Mitose. Die Fähigkeit zur Interaktion dieses Enzyms mit den unterschiedlichsten Substraten wird hauptsächlich durch die Eigenschaften der regulatorischen B-Untereinheit bestimmt (McCright *et al.*, 1996b).

Die regulatorischen B-Untereinheiten der B56-Familie weisen eine große Homologie in einem weiten Bereich ihrer Proteinsequenz auf (B56 Familien-Homolog, AS 61-469). Die 56 $\beta$ -Untereinheit verfügt außerdem über vier sogenannte *Low Complexity Region* (AS 6-25/32-48/142-161/446-477), die ein Mosaik aus einer kleinen Anzahl von Aminosäuren darstellen. Die funktionelle Bedeutung dieser Regionen ist jedoch bisher nicht charakterisiert worden (Abb. 7).

Eine mögliche Rolle der PP2A am Membrantransport läßt sich aus der Entdeckung ableiten, daß die eng mit B56 $\beta$  verwandte B-Untereinheit B56 $\gamma$  an der zytoplasmatischen Seite der *cis*-Golgi-Matrix lokalisiert ist, und der resultierende PP2A-Enzymkomplex den Vesikeltransport am Golgi unterbinden kann (Ito *et al.*, 2003). Es ist bekannt, daß der native ROMK-Kanal durch Serin/Threonin-Kinasen und entsprechende Phosphatasen in seiner Aktivität reguliert wird. Deshalb wurde PP2A B56 $\beta$  für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt.

### 3.3.3 GRB7

Eine Beute-cDNS kodierte für einen 455 AS Abschnitt (P78-L532) von GRB7 (*Growth factor Receptor Bound protein 7*, Margolis *et al.*, 1992). GRB7 ist ein Adapterprotein, das unter anderem die Signalweiterleitung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu intrazellulären Signalwegen vermittelt. Es besitzt eine Größe von 60 kDa (532 AS) und kommt vorwiegend im Pankreas und in der Niere vor (Leavey *et al.*, 1998; *Ascenta, Gene Logic*). GRB7 bildet zusammen mit den nahe verwandten GRB10- und GRB14-Proteinen die GRB7-Proteinfamilie. Diese Proteine sind hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, wurden aber auch an der Plasmamembran nachgewiesen (Daly, 1998; Han *et al.*, 2001).

Die Struktur dieser Proteine kann in eine N-terminale Prolin-reiche Region, eine Ras-assoziierte (RA)-Domäne, eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne, eine Phosphotyrosin-interagierende Region (PIR) und in eine C-terminale src-Homologie 2 (SH2)-Domäne (Shen & Guan, 2004) unterteilt werden (Abb. 8).

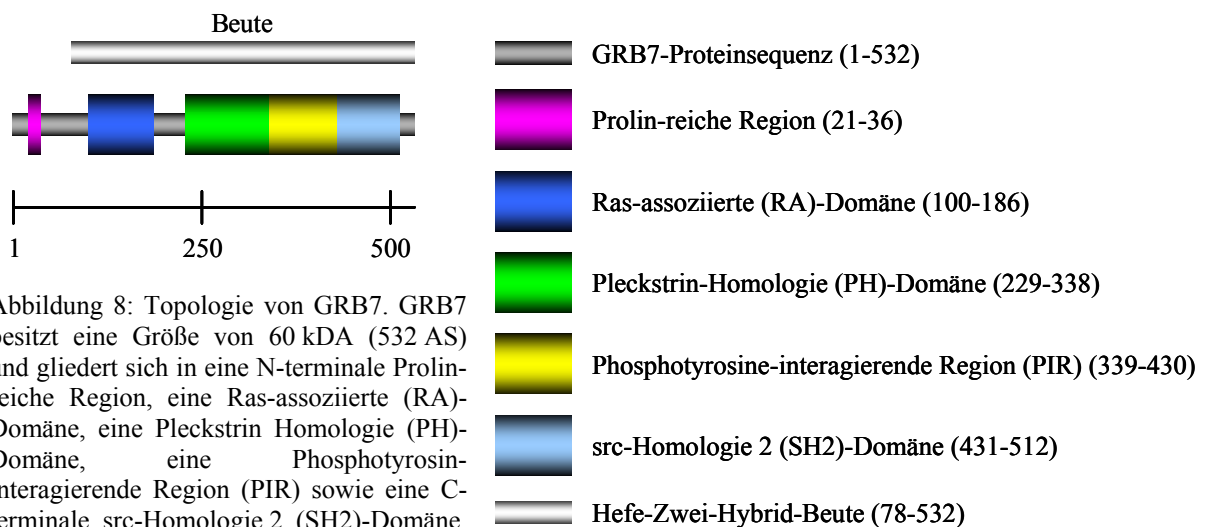


Abbildung 8: Topologie von GRB7. GRB7 besitzt eine Größe von 60 kDa (532 AS) und gliedert sich in eine N-terminale Prolin-reiche Region, eine Ras-assoziierte (RA)-Domäne, eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne, eine Phosphotyrosin-interagierende Region (PIR) sowie eine C-terminale src-Homologie 2 (SH2)-Domäne. Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 455 Aminosäuren.

Die Prolin-reiche Region enthält mehrere PXXP-Motive, die verschiedene Protein-Protein-Interaktionen durch Bindung an eine Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne anderer Proteine modulieren. Bisher wurde aber noch kein Protein identifiziert, das mit GRB7 in diesem Bereich interagiert (Kay *et al.*, 2000).

Die Existenz der RA-Domäne wird aufgrund von Sequenzähnlichkeiten angenommen (Wojcik *et al.*, 1999). Die RA-Domäne kommt in Proteinen vor, von denen einige als Effektoren der Ras GTPase bekannt sind. Dies legt die Vermutung nahe, daß auch die Proteine der GRB7-Familie möglicherweise als Effektoren und Regulatoren der Ras-Signalwege dienen. Bisher konnte jedoch die Interaktion mit GTPasen nicht nachgewiesen werden, weshalb die Funktion dieser Domäne noch unbewiesen ist (Leavey *et al.*, 1998).

Die PH-Domäne hat eine konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur mit einer Länge von etwa 110 Aminosäuren. Sie bildet eine „Sandwich“-Anordnung aus sieben  $\beta$ -Faltblättern, die an einem Ende durch eine  $\alpha$ -Helix abgeschlossen wird (Lemmon & Ferguson, 2000). Fast alle bekannten PH-Domänen binden Phospholipide. Diese Wechselwirkung reguliert die zelluläre Signaltransduktion, Membranlokalisation, Konformationsänderungen, Vesikeltransport, sowie die Organisation des Zytoskelettes (Lemmon *et al.*, 2002). Zusätzlich werden durch PH-Domänen auch Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen vermittelt (Gibson *et al.*, 1994; Tsukada *et al.*, 1994). PH-Domänen binden auch Phosphoinositole (Shen *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, daß bei der GRB7-vermittelten Signaltransduktion möglicherweise auch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) eine Rolle spielt, das als Aktivator von einwärtsrektifizierenden Kaliumkanälen beschrieben wurde (Hilgemann & Ball, 1996). Kürzlich wurde die Bindung von Calmodulin in dieser Region beschrieben, das die intrazelluläre Verteilung von GRB7 reguliert und mit Phosphoinositolen um die Interaktion mit der PH-Domäne konkurriert (Li *et al.*, 2005).

PIR ist eine neue funktionelle Region, die auch als BPS (Between PH and SH2) bezeichnet wird. Sie ist durch SH2-abhängige und SH2-unabhängige Interaktionen an der Signaltransduktion der GRB7-Proteinfamilie beteiligt und befindet sich zwischen der PH- und der SH2-Domäne (Kasus-Jacobi *et al.*, 2000).

Die C-terminale SH2-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen der GRB7-Proteinfamilie und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sowie weiteren Signalmolekülen. Die SH2-Domäne von GRB7 stimmt in ihrer Aminosäuresequenz mit denen von GRB10 und GRB14 zu 70% überein. Trotzdem interagieren die einzelnen Familienmitglieder mit unterschiedlichen funktionellen Partnerproteinen. Daraus wird die Bedeutung der SH2-Domäne für die Spezifität der einzelnen Mitglieder der GRB7-Proteinfamilie deutlich (Han *et al.*, 2001; Pawson & Gish, 1992).

Eine neue Funktion der GRB7-Proteinfamilie ergab sich aus dem Befund, daß GRB10 die vSrc-vermittelte Phosphorylierung und die damit verbundene Modulation der Funktion des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 verhindert. Dies deutet darauf hin, daß GRB10 die Bindung der vSrc-Kinase an das Kv1.3 Kanalprotein reguliert (Cook & Fadool, 2002). Diese Beteiligung des nahe verwandten GRB10 Proteins an der Regulation der Kv1.3-Kanalfunktion und der möglichen Beteiligung von PIP<sub>2</sub>, einem bekannten Aktivator des ROMK-Kanals, haben uns veranlaßt, die mögliche funktionelle Interaktion zwischen ROMK und GRB7 näher zu untersuchen.

### 3.3.4 NRF2 & CDR62

Sechs der isolierten Beute-cDNS kodierten für Abschnitte von Transkriptionsfaktoren. Eine Wechselwirkung von plasmamembranständigen Ionenkanälen mit Transkriptionsfaktoren scheint auf den ersten Blick nicht sehr wahrscheinlich. Dennoch könnten einige Transkriptionsfaktoren außer ihrer eigentlichen Funktion im Zellkern auch eine Funktion im Zytoplasma ausüben. Hierfür gibt es Beispiele aus der Literatur. So sind die KChIP-Proteine (*Kv Channel Interacting Proteins*) als regulatorische Untereinheiten von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen der Kv4-Familie beschrieben worden (An *et al.*, 2000). Für das KChIP3-Protein ist aber auch die Funktion als kalziumabhängiger Transkriptionsfaktor (DREAM) von Schmerzgenen nachgewiesen (Carrion *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel ist das KChAP (*K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*), welches ebenfalls die Aktivität verschiedener Kaliumkanäle modulieren kann (Wible *et al.*, 1998; Kuryshev *et al.*, 2000). KChAP wurde ursprünglich als PIAS3 (*Protein Inhibitor of Activated STAT3*) beschrieben, das die Bindung des Transkriptionsfaktors STAT3 an die DNS blockiert und dadurch die STAT3-abhängige Genaktivierung verhindert (Chung *et al.*, 1997).

Von den sechs gefundenen Transkriptionsfaktoren wurden NRF2 und CDR62 für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Diese Auswahl war willkürlich.

Die NRF2-cDNS (Nuclear factor (Erythroid-derived 2)-like 2, NM\_006164) kodiert für ein 375 AS-Fragment (K56-L430) dieses DNS-abhängigen Transkriptionsfaktors (Moi *et al.*, 1994). NRF2 hat eine Größe von 66 kDa (605 AS) und kommt ubiquitär vor. Eine besonders hohe Expression findet sich in der Muskulatur, Niere, Lunge und Leber (Swiss Prot). NRF2 gliedert sich in eine saure Aktivierungsdomäne, eine DNS-Bindedomäne sowie in eine Leucinzipperdomäne und besitzt am N-Terminus eine PKC-Phosphorylierungsstelle (Moi *et al.*, 1994; Swiss Prot).

Unter normalen Bedingungen wird NRF2 durch KEAP1 (*Kelch-like ECH-Associated Protein 1*) im Zytoplasma gehalten. KEAP1 ist an das Zytoskelett gebunden und vermittelt die Ubiquitinierung und Degradation von NRF2 (Kobayashi *et al.*, 2006). Neben seiner Funktion als NRF2-Repressor dient KEAP1 auch als Sensor für oxidativen Streß. Durch letzteren wird NRF2 PKC-

abhängig phosphoryliert. Es löst sich daraufhin von KEAP1 und wird in den Kern transportiert (Kang *et al.*, 2004), wo es an der Aktivierung von Genen des Beta-Globins (Moi *et al.*, 1994) und an der Induktion von Ferritin als Reaktion auf Xenobiotika beteiligt ist (Pietsch *et al.*, 2003). Die Bindung an die DNS erfolgt vermutlich als Heterodimer, das mit Hilfe der Leucinzipperdomäne mit einem bisher unbekanntem Protein gebildet wird. NRF2 wird durch das 26S-Proteasom abgebaut, dessen regulatorische Untereinheit ebenfalls als Interaktionspartner von ROMK im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifiziert wurde.

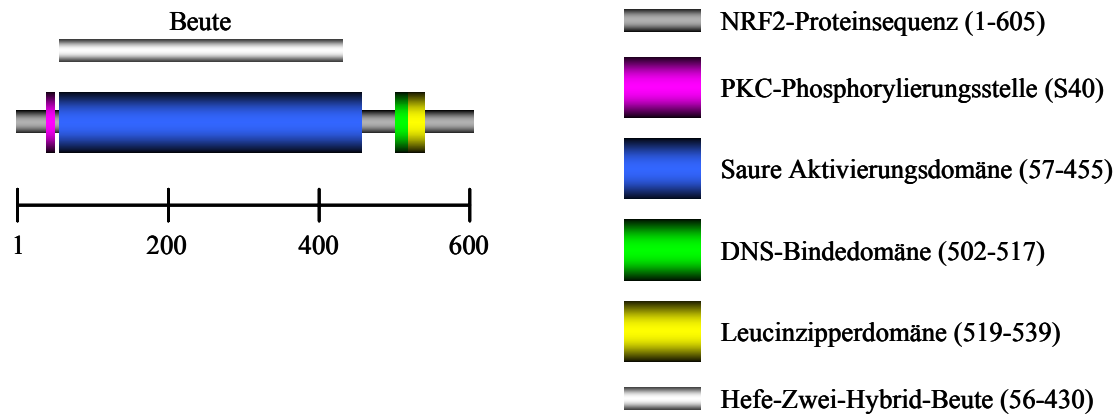


Abbildung 9: Topologie von NRF2. NRF2 besitzt eine Größe von 66 kDa (605 AS) und gliedert sich in eine saure Aktivierungsdomäne, eine DNS-Bindedomäne sowie einer Leucinzipperdomäne. An Position S40 befindet sich eine Phosphorylierungsstelle der Protein Kinase C (PKC). Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 375 Aminosäuren.

Die CDR62-Beute-cDNS (*Cerebellar degeneration-related 2*) kodiert für ein 212 AS-Fragment (L121-I332) des Proteins, das ursprünglich als Autoantigen beschrieben wurde. Eine Leucinzipperdomäne, ein Zinkfinger-Motiv und eine Aktivierungsdomäne charakterisieren dieses Protein als Transkriptionsfaktor, obwohl eine DNS-Bindedomäne fehlt (Fathallah-Shaykh *et al.*, 1991).

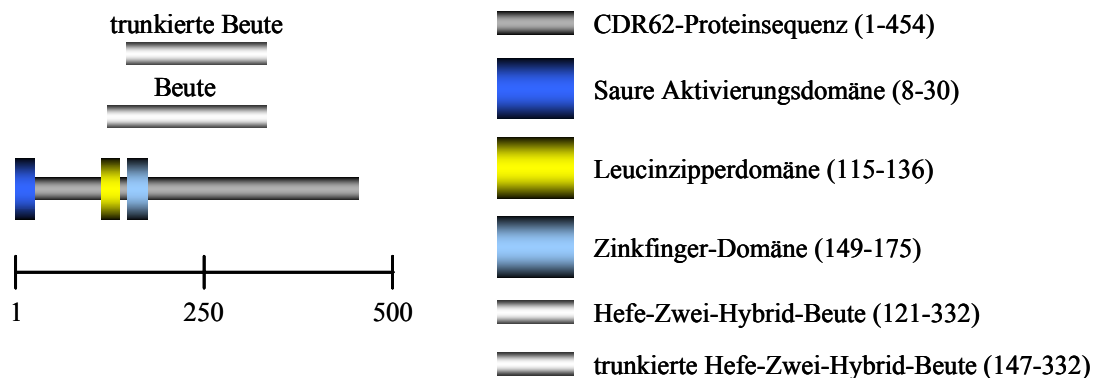


Abbildung 10: Topologie von CDR62. CDR62 besitzt eine Größe von 62 kDa (454 AS) und gliedert sich in eine saure Aktivierungsdomäne, einen Leucinzipper- sowie eine Zinkfinger-Domäne. Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 212 Aminosäuren. Mit Hilfe eines N-terminal um 26 Aminosäuren verkürzten Kontrollkonstruktes (hCDR62(106-332) pGADT7), das keine Leucinzipperdomäne enthielt, wurde die spezifische Interaktion mit dem ROMK-C-Terminus gezeigt.

Die genaue biologische Funktion von CDR62 ist noch unklar. Man geht aber davon aus, daß es über seine Leucizipperdomäne mit anderen Proteinen interagiert, die ebenfalls über eine solche Domäne verfügen (Sakai *et al.*, 2002). CDR62 hat eine Größe von 62 kDa (454 AS) und kommt weit verbreitet vor (*Ascenta, Gene Logic*). Da das CDR62-Beutekonstrukt ebenfalls für eine Leucizipperdomäne kodiert, wurde in einem zusätzlichen Kontrollexperiment die Spezifität der Interaktion bestätigt. Hierzu wurde ein Beutefusionsprotein ohne die N-terminale Leucizipperdomäne eingesetzt (hCDR62(106-332) pGADT7). Dieses verkürzte Protein konnte immer noch an den C-Terminus von ROMK binden, womit eine spezifische Interaktion von CDR62 mit dem Kaliumkanal gezeigt werden konnte.

### 3.3.5 Proteine mit unbekannter Funktion

Fünf der isolierten cDNS-Klone kodierten für Proteine, deren Funktion noch unbekannt ist. Stellvertretend für diese Gruppe wurden C13orf22 und TNRC5 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Beide Proteine weisen eine ubiquitäre Gewebsverteilung mit einer stärkeren Expression in Immunzellen auf (*Ascenta, Gene Logic*). Sequenzähnlichkeiten bestanden lediglich zu solchen Proteinen, deren Funktion ebenfalls nicht bekannt war (*ProDom*).

Die Beute-cDNS von C13orf22 (*Chromosome 13, open reading frame 22*) kodiert für ein 313 AS-Fragment (R780-Y1092). Das Protein hat eine Größe von 120 kDa (1092 AS). In den Swiss-Prot-, PROSITE- und InterPro-Datenbanken ist das Protein mit möglichen Funktionen als Ubiquitin-abhängige Hydrolase, Endopeptidase und Thiolesterase annotiert. Es könnte sich daher um eine Peptidase handeln, die an der Prozessierung von poly-ubiquitinierten Vorläuferproteinen oder bei der Degradation von ubiquitinierten Proteinen beteiligt ist. C13orf22 wurde ausgewählt, weil das ROMK-Protein ebenfalls ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom abgebaut wird (Lin *et al.* 2005).

Die Beute-cDNS von TNRC5 (*Tri-Nucleotide Repeat Containing 5*) kodiert für ein 221 AS großes Fragment (E58-L278). Das Protein hat eine Größe von 31 kDa (278 AS). Die cDNS von TNRC5 weist, wie aus dem Namen ersichtlich, viele Wiederholungen des Trinukleotids CAG auf. Diese Besonderheit wirkt sich allerdings nur auf die übergeordnete Struktur der chromosomalen DNS in diesem Bereich aus (Brahmachari *et al.*, 1995), nicht aber auf die Funktion des Proteins, über die bisher keine Informationen vorliegen. In der InterPro-Datenbank ist das Protein mit einer möglichen N-terminalen Transmembrandomäne annotiert.

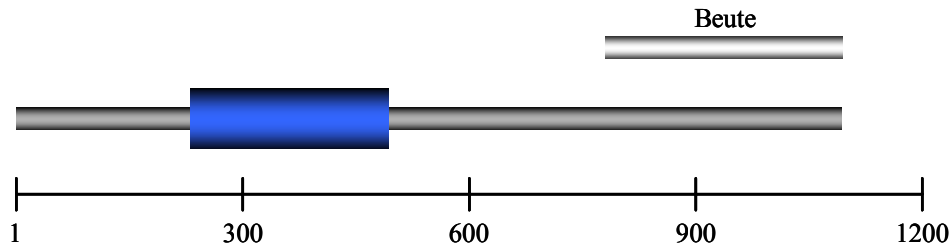





Abbildung 11: Topologie von C13orf22. Von den möglichen Funktionen als Ubiquitin-abhängige Hydrolase, Endo-peptidase und Thiolesterase wurde bisher nur ein Ubiquitin-Hydrolase-Profil lokal zugeordnet. Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 331 Aminosäuren. Das vollständige Protein besitzt eine Größe von 120 kDa (1092 AS).

 C13orf22-Proteinsequenz (1-1092)  
 Ubiquitin-Hydrolase-Profil (230-490)  
 Hefe-Zwei-Hybrid-Beute (780-1092)

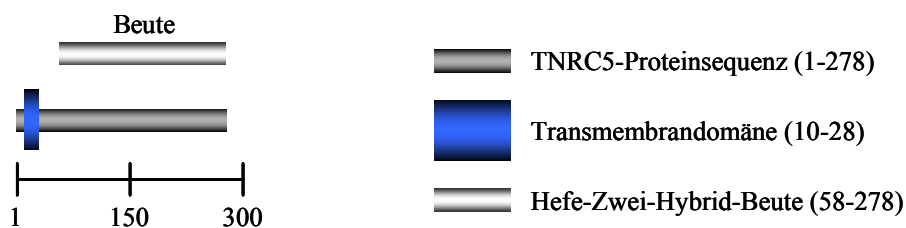


Abbildung 12: Topologie von TNRC5. Das Protein besitzt eine Größe von 31 kDa (278 AS) und weist viele Wiederholungen des Trinukleotids *CAG* auf. Eine mögliche Transmembrandomäne ist vorhergesagt. Die Funktion wurde bisher nicht beschrieben. Der Beuteklon aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay hatte eine Größe von 221 Aminosäuren.

### 3.4 Funktionelle Charakterisierung von Golgin-160

Aufgrund der bekannten Golgilokalisation von Golgin-160 vermuteten wir, daß das Protein eine Rolle beim Membrantransport des ROMK-Kanals spielen könnte. Als erster Schritt bei der weitergehenden Charakterisierung dieser Möglichkeit sollte die durch eine molekularbiologische Methode nachgewiesene Bindung an das ROMK-Kanalprotein mit proteinbiochemischen Methoden bestätigt werden. Dies sollte durch GST-Affinitätsfällung oder Koimmunpräzipitation erfolgen.

#### 3.4.1 Koimmunpräzipitation von ROMK und Golgin-160

Für die GST-Affinitätsfällung (*GST-Pulldown*) sollte mit Hilfe eines Fusionsproteins aus ROMK-C-Terminus und Glutathion-S-Transferase (GST) Golgin-160 aus einem Zellextrakt präzipitiert werden. In Kontrolleexperimenten war aber Golgin-160 selbst in der Lage, an die Glutathion-S-Transferase zu binden, weshalb dieser Ansatz für die geplanten Versuche ungeeignet war. Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis der Interaktion beider Proteine durch Koimmunpräzipitation.

Vorversuche hatten gezeigt, daß sich das heterolog exprimierte ROMK-Protein unter den verwendeten Extraktionsbedingungen nicht aus Zellextrakten von HEK293- und CHO-Zellen oder aus *Xenopus laevis* Oozyten isolieren ließ. Unter denselben Bedingungen konnte aber das MaxiK-Kanalprotein aus entsprechenden Zellextrakten gewonnen werden, obwohl es wesentlich größer ist als der ROMK-Kanal (120 kDa versus 45 kDa) und auch mehr hydrophobe Transmembranbereiche besitzt. Es mußte daher angenommen werden, daß das ROMK-Protein zu einem hohen Grad mit dem Zytoskelett vernetzt ist und sich nur unter wesentlich stringenteren Bedingungen, die dann allerdings für eine erfolgreiche Koimmunpräzipitation untauglich wären, extrahieren läßt.

Für die Koimmunpräzipitation wurde deshalb nur der zytosolische C-Terminus von ROMK eingesetzt. Der mit einem HA-Antigenepitop markierte ROMK-C-Terminus wurde zusammen mit dem FLAG-Epitop-markierten Golgin-160 in HEK293-Zellen koexprimiert. Beide Proteine wurden in parallelen Ansätzen mit Antikörpern, die gegen das jeweilige Epitop gerichtet waren, aus Zellextrakten immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Anschluß elektrophoretisch aufgetrennt, einer Western-Transferanalyse (Western-Blot) unterzogen und die kopräzipitierten Proteine mit den entsprechenden spezifischen Antiseren nachgewiesen.

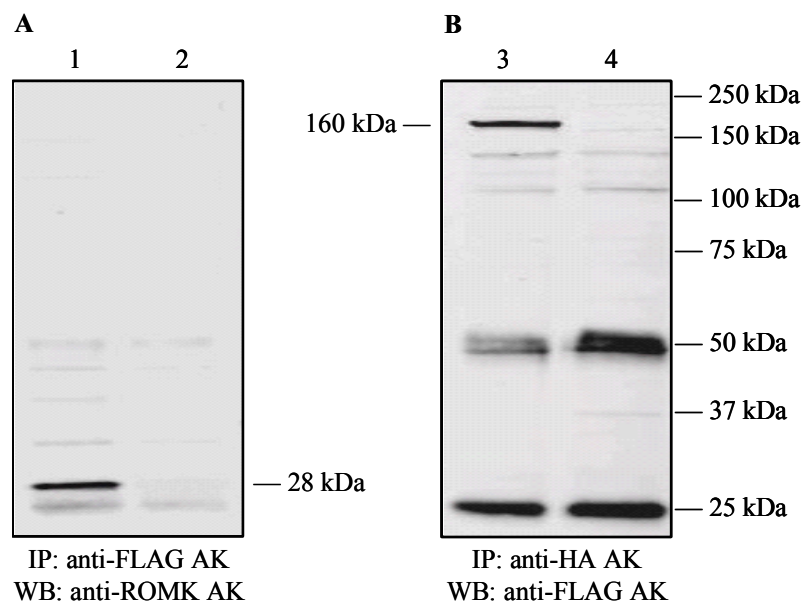


Abbildung 13: Koimmunpräzipitation von ROMK mit Golgin-160. *A*, die Immunpräzipitation (IP) wurde mit anti-FLAG Antikörper (AK) gegen das antigenmarkierte Golgin-160 durchgeführt und im Western-Blot (WB) wurde der assoziierte, 28 kDa ROMK-C-Terminus mit anti-ROMK Antikörpern nachgewiesen. *B*, die Immunpräzipitation wurde mit anti-HA Antikörper gegen den antigenmarkierten ROMK-C-Terminus durchgeführt und im Western-Blot wurde das assoziierte, antigenmarkierte und 160 kDa große Golgin-160 mit anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen. Zusätzlich sind die leichten (25 kDa) und schweren (50 kDa) Kette der IP-AK durch Kreuzreaktion mit dem sekundären AK des WB sichtbar. In Spur 1 und 3 wurde ein Lysat aus HEK293-Zellen verwendet, die Golgin-160 und den ROMK-C-Terminus exprimierten. Das Lysat in Spur 2 enthielt nur den ROMK-C-Terminus. Das Lysat in Spur 4 enthielt nur Golgin-160. Die Immunpräzipitate wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt und gemeinsam auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Wie in Abbildung 13 ersichtlich ist, konnten in beiden Ansätzen die assoziierten Proteine nachgewiesen werden. So konnte nach Immunpräzipitation des ROMK-C-Terminus im nachfolgenden



Western-Blot das kopräzipitierte 160 kDa große Golgin-160 detektiert werden (Abb. 13B, Spur 3). Umgekehrt wurde nach vorheriger Immunpräzipitation von Golgin-160 das 28 kDa große C-terminale Proteinfragment von ROMK im Präzipitat nachgewiesen (Abb. 13A, Spur 1). Die Spezifität der verwendeten Antisera wurde zuvor in Kontrollexperimenten gezeigt. Es wurden keine kopräzipitierten Proteine detektiert, wenn jeweils eines der beiden Proteine in den Säugerzellen exprimiert wurde (Abb. 13A, Spur 2; Abb. 13B, Spur 4). Das Ergebnis der Koimmunpräzipitation bestätigte damit die spezifische Interaktion zwischen dem ROMK-C-Terminus und dem Golgin-160.

Nachdem die direkte Interaktion zwischen ROMK und Golgin-160 mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden konnte, sollte deren subzelluläre Lokalisation aufgeklärt werden. Dabei stellte sich die Frage, ob beide Proteine tatsächlich koloalisieren und ob die jeweilige intrazelluläre Verteilung durch die Anwesenheit des Interaktionspartners beeinflusst wird.

### 3.4.2 Immunzytochemische Lokalisation

Mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie wurde die Lokalisation von ROMK und Golgin-160 in einer Säugerzelle untersucht. Hierzu wurden ROMK und FLAG-markiertes Golgin-160 einzeln und gemeinsam in COS-7-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden unter Mikrotubuli-stabilisierenden Bedingungen fixiert und permeabilisiert, um den Zugang der jeweiligen Antikörper zum Zytoplasma zu gewährleisten. Auf diese Weise konnten die heterolog exprimierten Proteine mit spezifischen primären und Fluorophor-markierten sekundären Antikörpern nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde ein Fusionsproteinkonstrukt aus ROMK und GFP (ROMK-GFP) verwendet, mit dessen Hilfe die subzelluläre Lokalisation von ROMK ohne eine Permeabilisierung der Zellen und ohne die Verwendung von Antikörpern detektiert werden konnte. In Abbildung 14 sind repräsentative Aufnahmen mehrerer unabhängiger Experimente dargestellt.

Zellen, die nur ROMK (Abb. 14G) oder ROMK-GFP (Abb. 14J) exprimierten, zeigten eine starke perinukleäre Färbung, die sich in das Zytoplasma fortsetzte, aber nur ein schwaches Signal an der Plasmamembran. Obwohl ROMK ein plasmamembranständiger Ionenkanal ist, liegt nach Überexpression der größte Teil des Proteins intrazellulär vor. Dieses starke zytoplasmatische Signal beruht im wesentlichen auf einer Akkumulation des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat (Yoo *et al.*, 2003, 2004). Der ROMK-Wildtyp (Abb. 14G) zeigte die gleiche Verteilung wie das ROMK-GFP-Fusionsprotein (Abb. 14J). Golgin-160 wurde in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Misumi *et al.*, 1997) ausschließlich im Golgi-Apparat nachgewiesen (Abb. 14E).

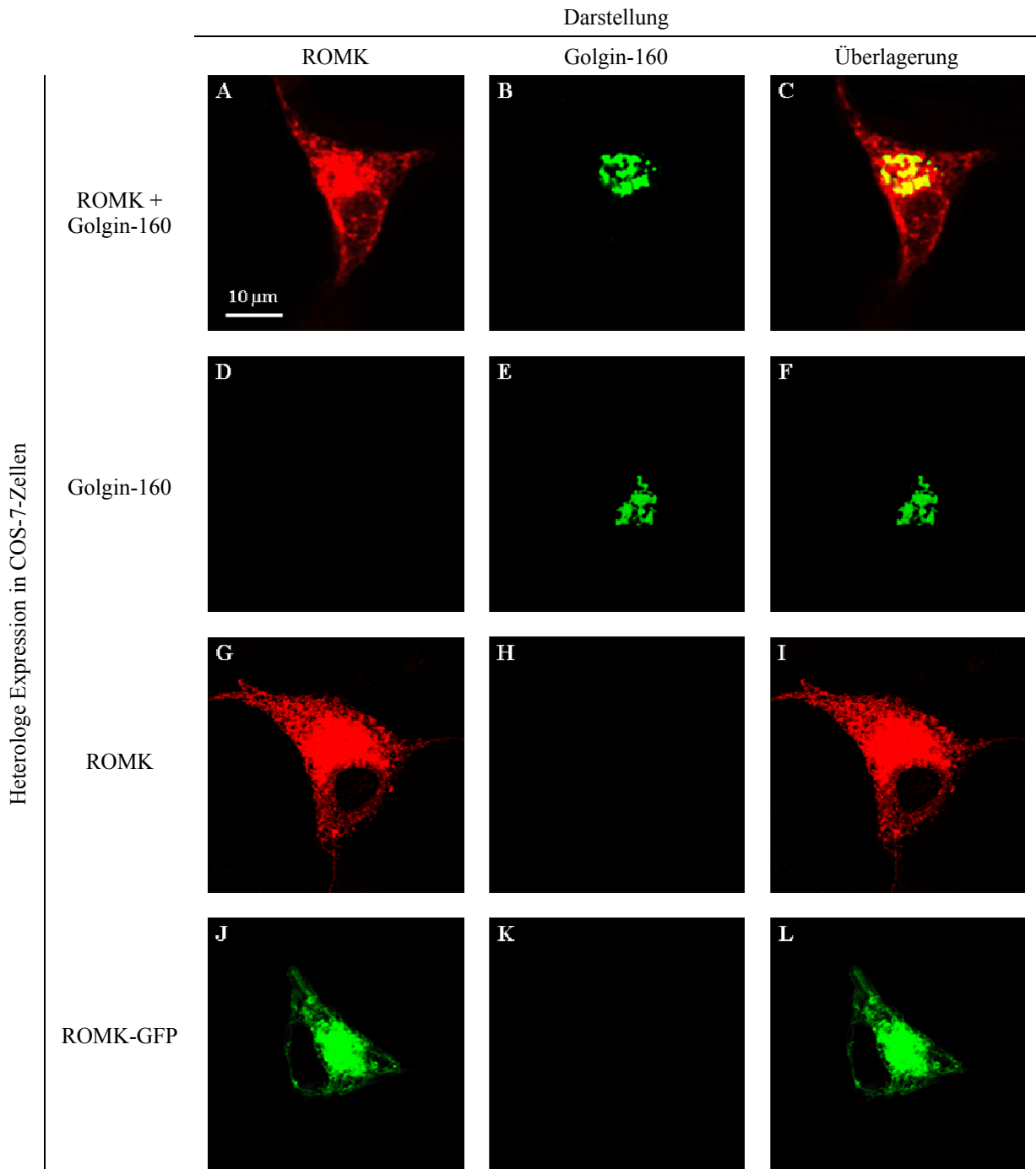


Abbildung 14: Intrazelluläre Lokalisation von ROMK und Golgin-160. COS-7-Zellen wurden mit ROMK und FLAG-markiertem Golgin-160 (A-C), FLAG-markiertem Golgin-160 (D-F), ROMK (G-I) oder ROMK-GFP (J-L) transfiziert. Die Zellen in A-I wurden unter permeabilisierenden Bedingungen fixiert und nacheinander mit primären Anti-ROMK (Kaninchen) und Anti-FLAG (Maus) Antikörpern und sekundären Alexa Fluor 488 Anti-Maus und 546 Anti-Kaninchen Antikörpern inkubiert. Die Lokalisation von ROMK ist in der linken, die von Golgin-160 in der mittleren und die Überlagerung beider Signale in der rechten Spalte gezeigt. Ein Größenmaßstab befindet sich in Bild A.

Da mit den verwendeten Antikörpern in nicht-transfizierten Zellen keine Fluoreszenzsignale registriert wurden (Abb. 14D, H), konnte eine unspezifische Färbung sowie eine Autofluoreszenz ausgeschlossen werden. Die Verteilung von ROMK und Golgin-160 war in den kotransfizierten (Abb. 14A, B) und den einzeln transfizierten Zellen (Abb. 14E, G) identisch. Die durch Überlagerung der Aufnahmen von Abbildung 14A und 14B resultierende gelbe Färbung zeigt eine Kollokalisierung von ROMK und Golgin-160 im Golgi-Apparat (Abb. 14C). Eine Zunahme der ohnehin sehr geringen Expression von ROMK an der Plasmamembran konnte nach Koexpression mit Golgin-160 nicht gezeigt werden (ohne Abbildung). Dafür war die Empfindlichkeit des verwendeten Detektionssystems offensichtlich zu gering.

Die in den vorherigen Versuchen nachgewiesene physikalische Interaktion zwischen ROMK und Golgin-160 wurde durch den Nachweis der Kollokalisierung beider Proteine im Golgi-Apparat mit Hilfe von immunzytochemischen Untersuchungen bestätigt. Dies erhärtete die Hypothese, daß Golgin-160 eine Rolle beim Membrantransport von ROMK spielen könnte. Eine mögliche funktionelle Wechselwirkung sollte daher im Folgenden mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden näher untersucht werden.

### 3.4.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Wirkung von Golgin-160 auf die biophysikalischen Eigenschaften von ROMK (Bleich *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 1993) wurde mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) im *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionssystem untersucht. Hierzu wurde ROMK entweder allein oder zusammen mit Golgin-160 in Oozyten injiziert und die funktionelle Expression des Kanalproteins durch die Messung der resultierenden Kaliumströme bestimmt.

Die Injektion von ROMK-cRNS führte bereits nach zwei Tagen zu charakteristischen leicht einwärts-gleichrichtenden Kaliumströmen (Abb. 15). Golgin-160 allein erzeugte dagegen keine meßbaren Ströme. Nach Koinjektion von Golgin-160 mit ROMK waren jedoch die Amplituden der im Bereich von -120 mV bis +40 mV gemessenen ROMK-Ströme signifikant erhöht. Die durchschnittliche ROMK-Stromamplitude verdoppelte sich bei einem Potential von 0 mV von 1,55  $\mu\text{A}$  ( $\pm 0,27 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) auf 3,08  $\mu\text{A}$  ( $\pm 0,33 \mu\text{A}$ ,  $n = 16$ ,  $P < 0,01$ ) (Abb. 15). In mehreren Experimenten mit verschiedenen Präparationen von cRNS und Oozyten wurde reproduzierbar eine zweifache Erhöhung der Stromamplitude von ROMK durch die Koexpression mit Golgin-160 nachgewiesen. Änderungen in der Kinetik der Ströme durch Golgin-160 wurden aber nicht beobachtet (Abb. 15). Die Zunahme der Kaliumströme erfolgte gleichförmig über den gesamten ausgewählten Spannungsbereich, d.h. sie war unabhängig von der gewählten Membranspannung.

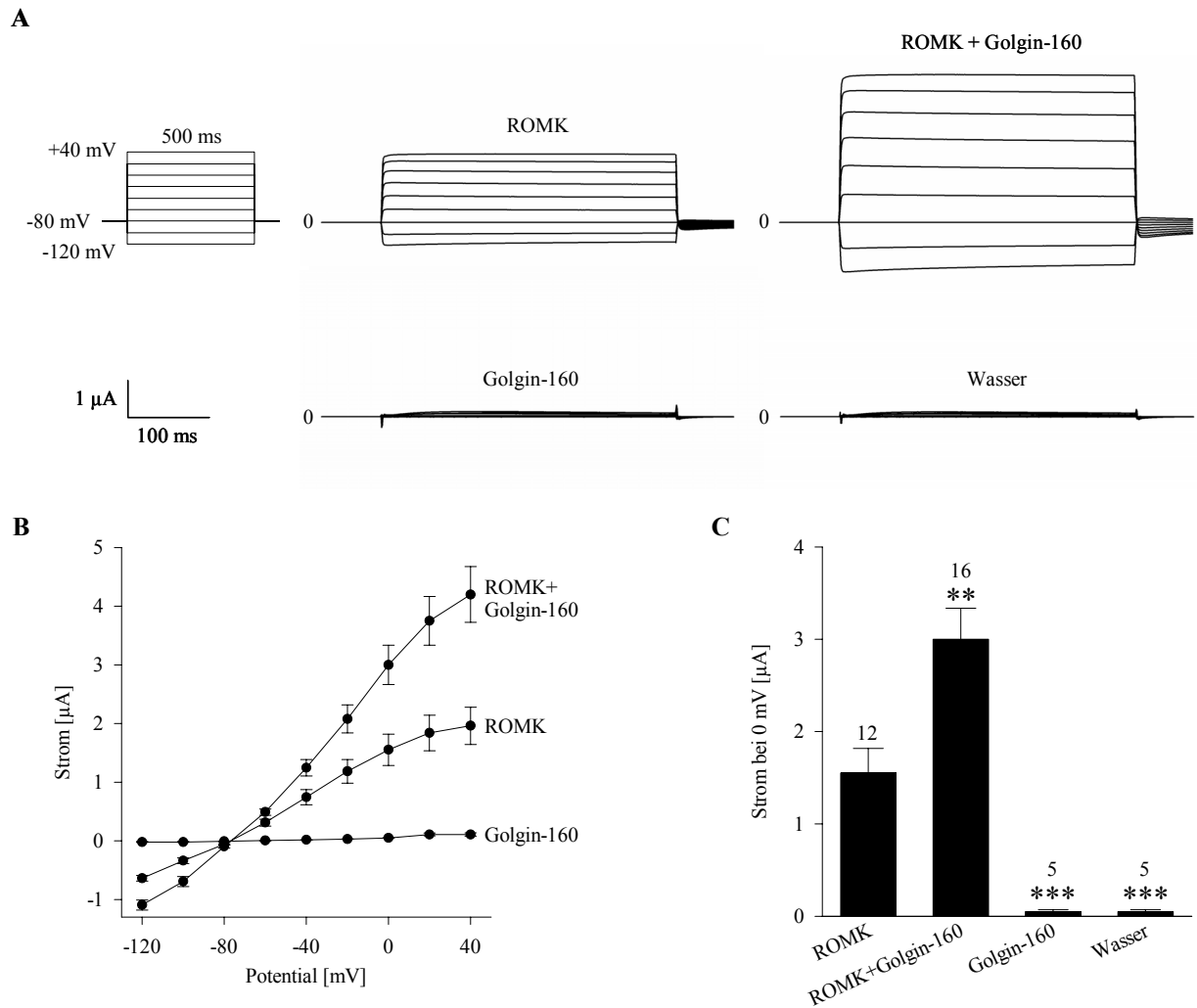


Abbildung 15: Effekt von Golgin-160 auf den ROMK-Strom. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und/oder 1,15 ng hGolgin-160-cRNS. Mit Wasser injizierte Oozyten dienten als Kontrolle. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe *B*, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur ROMK exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Zur weiteren Bestätigung der beobachteten Wirkung des Golgi-Proteins wurde als nächstes das mit ROMK engverwandte Kir2.1-Kanalprotein (Kubo *et al.*, 1993) untersucht. Im Unterschied zu ROMK erzeugt Kir2.1 stark einwärts gerichtete Kaliumströme (Abb. 16). Die Koexpression mit Golgin-160 führte wie bei ROMK auch zu einer Zunahme im Bereich von -160 mV bis 0 mV. In den in Abbildung 16 dargestellten Versuchen wurde bei -160 mV ebenfalls eine Verdopplung der Amplitude des Kir2.1-Stroms von  $-1,21 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,12 \mu\text{A}$ ,  $n = 11$ ) auf  $-2,59 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,29$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0,001$ ) gemessen. In einigen Experimenten konnte sogar eine Verdreifachung des Kir2.1-Stroms durch Golgin-160 festgestellt werden.

Um auszuschließen, daß die Erhöhung der gemessenen Ströme lediglich auf eine allgemeine Stimulation der Proteintranslations-Maschinerie als Folge der koinjizierten Golgin-160-cRNS beruhte, wurde ROMK mit einer nicht funktionellen Spleißvariante der MaxiK-Kaliumkanals koexprimiert.

Diese Spleißvariante akkumuliert im ER und erreicht die Plasmamembran nicht (unpublizierte Daten). Da sie daher keinen Strom erzeugt und eine ähnliche molare Masse wie Golgin-160 besitzt, eignete sie sich als Kontrolle für das intrazelluläre Golgin-160. Die koexprimierte MaxiK- $\alpha$ -Untereinheit beeinflusste im Gegensatz zu Golgin-160 den Strom von ROMK nicht (ohne Abbildung).

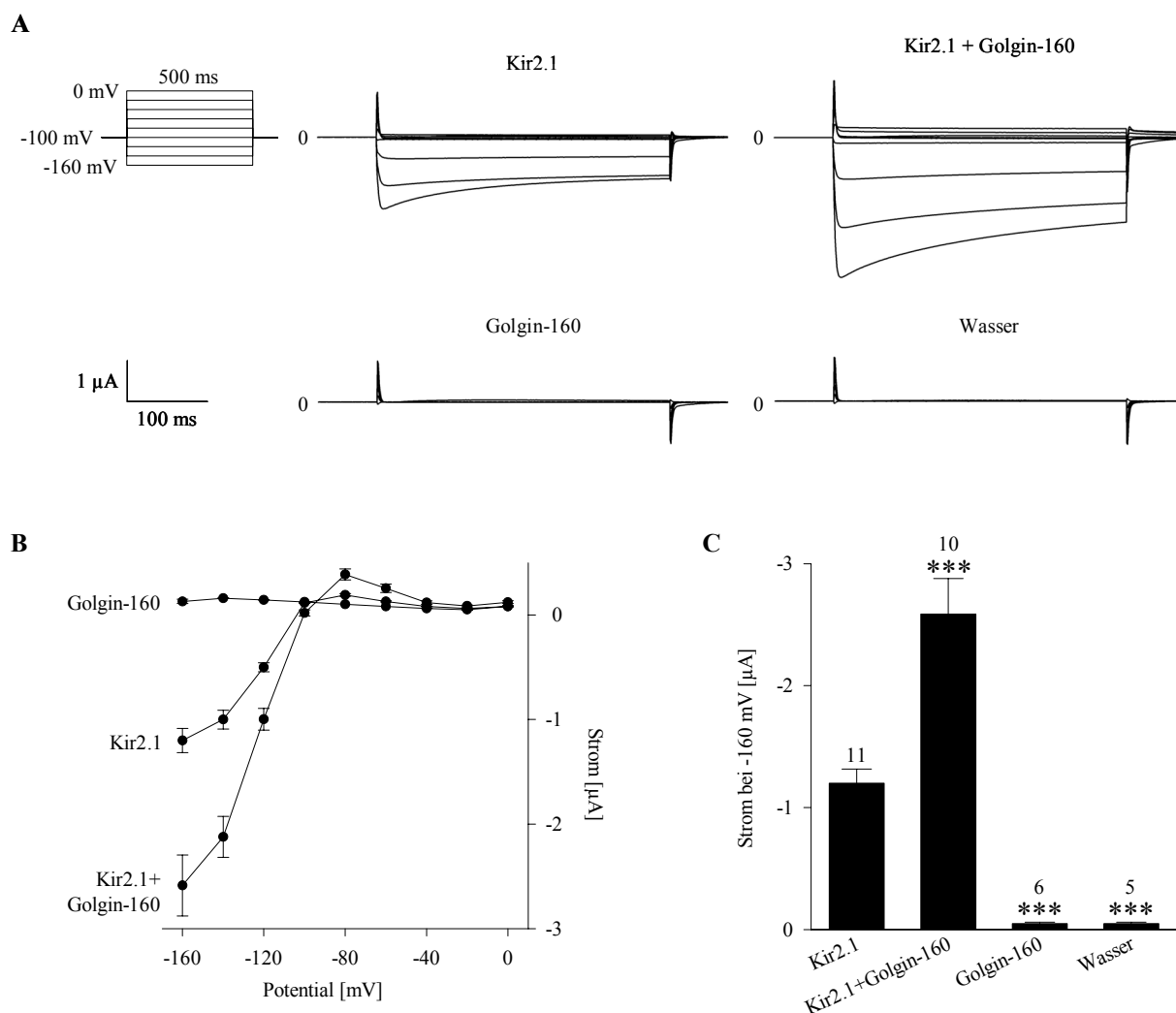


Abbildung 16: Effekt von Golgin-160 auf den Kir2.1-Strom. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,1 ng hKir2.1- und/oder 1,15 ng hGolgin-160-cRNS. Mit Wasser injizierte Oozyten dienen als Kontrolle. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *B*, Strom-Spannungskurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von -160 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur Kir2.1 exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen in *C* angegeben.

Der Einfluß von Golgin-160 wurde auch in Abhängigkeit der injizierten Menge an cRNS untersucht. Die Stimulation des ROMK-Stroms wurde sowohl mit geringen (1,15 ng cRNA / Oozyte) als auch größeren (5,0 ng cRNS / Oozyte) Mengen an koinjizierter Golgin-160-cRNS beobachtet (ohne Abbildung). Die Menge an ROMK- und Kir2.1-cRNS wurde generell gering gehalten (ROMK: 0,05 ng cRNS / Oozyte, Kir2.1: 0,1 ng cRNS / Oozyte), da bei großen Mengen injizierter cRNS (5,0 ng cRNS / Oozyte) kein stimulierender Effekt des koexprimierten Golgin-160 mehr zu beobachten war (ohne Abbildung). Eine naheliegende Erklärung für die letztere Beobachtung ist, daß

die kleineren Kanalproteine viel schneller exprimiert werden als das wesentlich größere Golgin-160, und daß eine bestimmte Mindestzeit benötigt wird, damit eine ausreichende Expression von Golgin-160 erzielt und damit auch der stimulatorische Effekt sichtbar werden kann.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde deshalb auch der Einfluß der Inkubationszeit auf den Effekt von Golgin-160 untersucht (Abb. 17). Hierfür wurde Kir2.1 entweder alleine oder zusammen mit Golgin-160 in Oozyten exprimiert und die resultierenden Ströme über einen Zeitraum von insgesamt 84 h gemessen. Während die größten Kir2.1-Ströme erst nach 72 h mit einer Amplitude von  $3,13 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,33 \mu\text{A}$ ,  $n = 6$ ) bzw.  $10,12 \mu\text{A}$  ( $\pm 1,32 \mu\text{A}$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0,001$ ) nach Koexpression mit Golgin-160 beobachtet wurden, war die Stimulation durch Golgin-160 bereits nach 24 h sichtbar. Sie erreichte nach 48 h ihr Maximum und blieb im weiteren Verlauf konstant (Abb. 17).

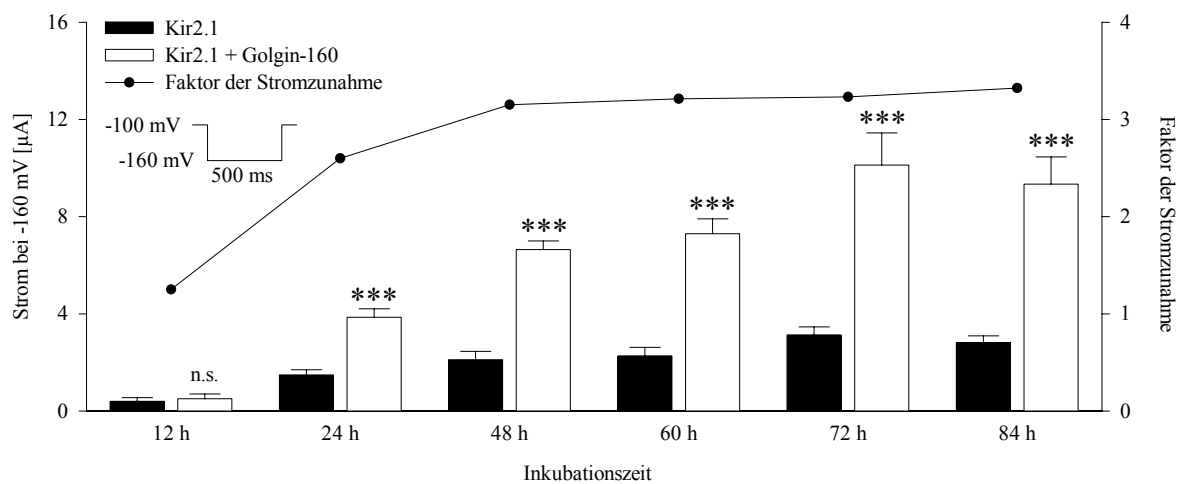


Abbildung 17: Einfluß der Inkubationszeit auf den Effekt von Golgin-160. Mittlere Kir2.1-Stromamplitude ( $\pm$  SEM) aus 5 bis 10 Oozyten bei einem Potential von  $-160 \text{ mV}$  zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von  $0,1 \text{ ng hKir2.1}$ - (schwarze Säulen) und zusätzlich  $1,15 \text{ ng hGolgin-160-cRNS}$  (weiße Säulen) sowie Faktor der Stromzunahme (Linie). Sternchen zeigen Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur Kir2.1 exprimierten. Alle Oozyten wurden demselben Tier entnommen und zur selben Zeit injiziert.

Zusammenfassend läßt sich daher feststellen, daß die Zunahme der Stromamplitude durch eine spezifische Wirkung von Golgin-160 auf die Aktivität der beiden Kir-Kanäle und nicht durch eine generelle Stimulation der Proteinbiosynthese verursacht wurde. Das Ausmaß der Stimulation durch Golgin-160 war von der injizierten Menge an Kanal-cRNS sowie von der Inkubationszeit abhängig. Die Resultate der durchgeführten Bindungsstudien legen nahe, daß bei ROMK die Stimulation durch die direkte Interaktion von Golgin-160 mit dem C-Terminus von ROMK zustande kommt. Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit kann dies auch für Kir2.1 als sehr wahrscheinlich angenommen werden.

Um das Wirkungsspektrum von Golgin-160 noch näher zu charakterisieren, wurde in weiteren Untersuchungen eine Koexpression von Golgin-160 mit den entfernt verwandten spannungsgesteuerten Kaliumkanälen Kv1.5, Kv4.3 und HERG durchgeführt (Abb. 18 bis 20).

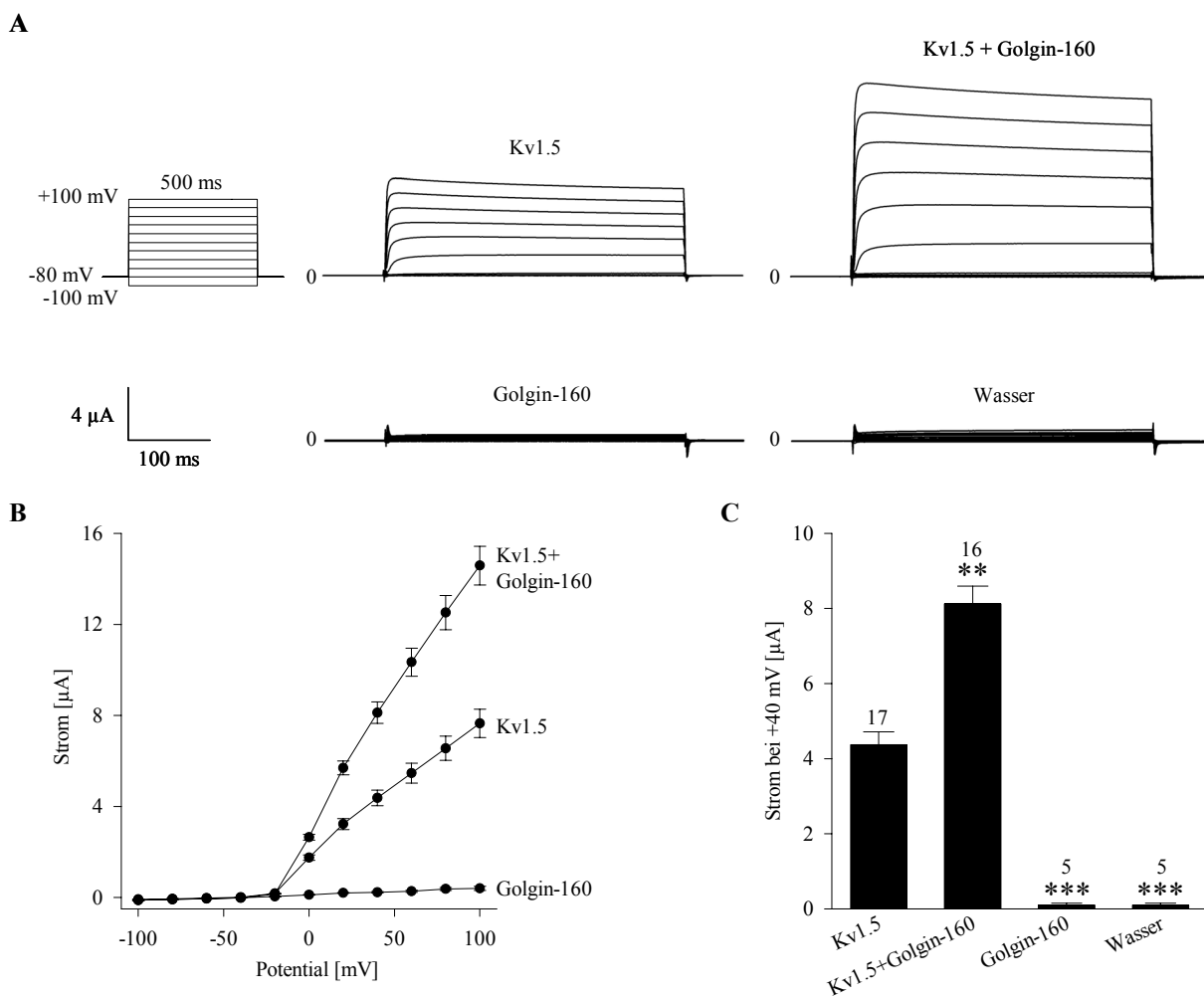


Abbildung 18: Einfluß von Golgin-160 auf den Kv1.5-Strom. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,16 ng hKv1.5- und/oder 1,15 ng Golgin-160-cRNS. Mit Wasser injizierte Oozyten dienen als Kontrolle. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *B*, Strom-Spannungskurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von +40 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur Kv1.5 exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Die Injektion von Kv1.5-cRNS führte nach zwei Tagen zu charakteristischen leicht inaktivierenden Kaliumströmen (Abb. 18). Die Injektion von Kv4.3-cRNS erzeugte typische, stark inaktivierende Kaliumströme (Abb. 19). Im Bereich der untersuchten Potentiale von -100 mV bis +100 mV bei Kv1.5 und -80 mV bis +60 mV bei Kv4.3 kam es nach Koexpression mit Golgin-160 zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplituden beider Kanäle. Die Zunahme konnte in einer Reihe von unabhängigen Experimenten reproduziert werden. Bei +40 mV erhöhte sich der Kv1.5-Strom durchschnittlich um das 1,9-fache von  $4,37 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,34 \mu\text{A}$ ,  $n = 17$ ) auf  $8,12 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,48 \mu\text{A}$ ,  $n = 16$ ,  $P < 0,01$ ) (Abb. 18). Der Kv4.3-Strom erhöhte sich bei +40 mV um das 1,7-fache von  $5,70 \mu\text{A}$  ( $\pm 1,13 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) auf  $10,22 \mu\text{A}$  ( $\pm 1,84 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0,05$ ) (Abb. 19). Bei beiden Kanälen wurden die Kinetiken durch das koexprimierte Golgin-160 nicht verändert. Diese Ergebnisse zeigen, daß auch bei spannungsaktivierten Kaliumkanälen eine Stromzunahme nach Koexpression von Golgin-160 erfolgte.

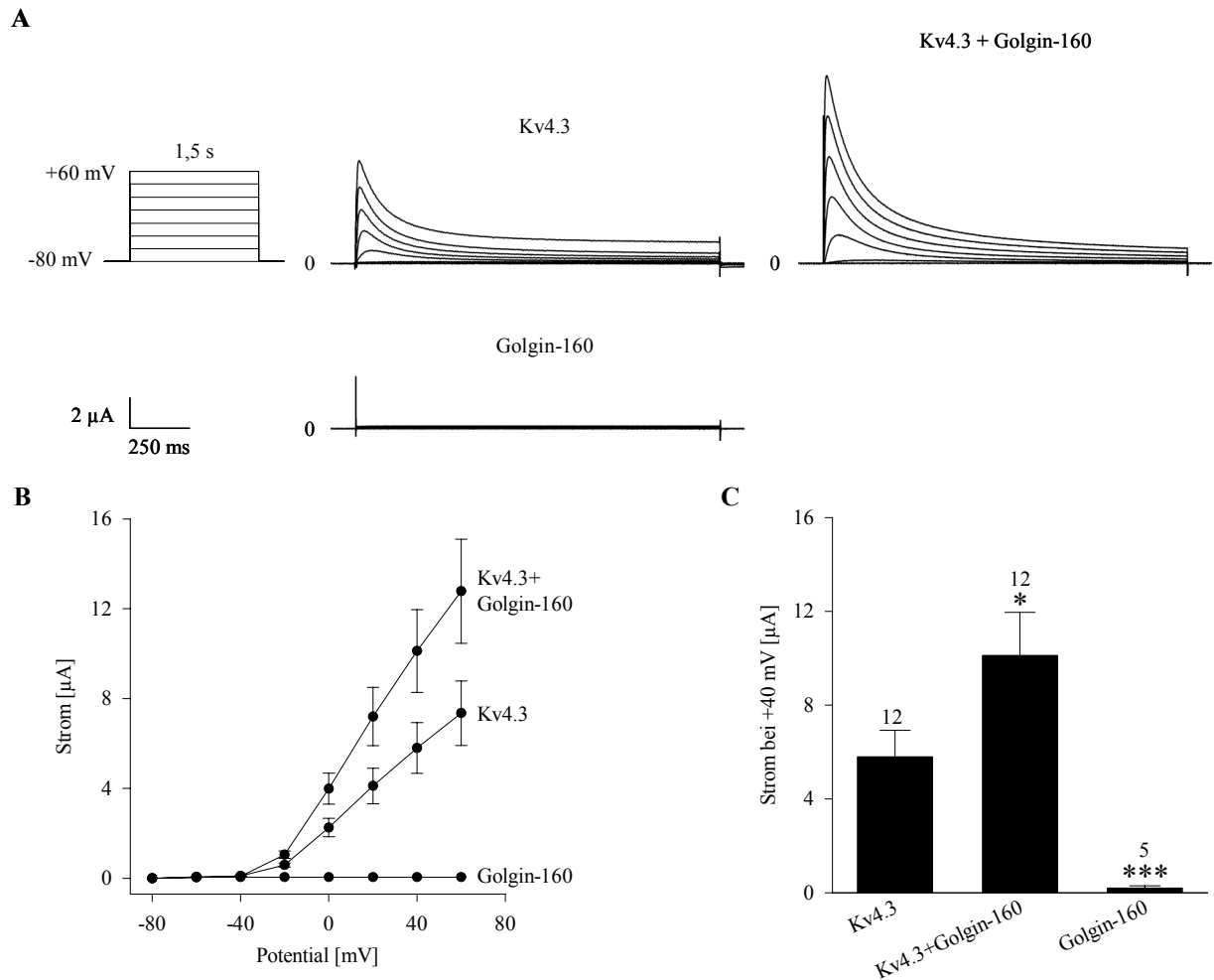


Abbildung 19: Einfluß von Golgin-160 auf den Kv4.3-Strom. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 72 h nach Injektion von 0,10 ng hKv4.3- und/oder 1,15 ng Golgin-160-cRNS. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *B*, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von +40 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur Kv4.3 exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Die Koexpression des HERG-Kanalproteins mit Golgin-160 sowie GM130 (Fritzler *et al.*, 1993), einem weiteren Golgi-Protein, das in Abschnitt 3.4.6 ausführlich besprochen wird, zeigte dagegen ein anderes Bild. Entsprechend den Ergebnissen von Roti Roti und Mitarbeitern (2002) erniedrigt GM130 in unseren Experimenten den mittleren *Tail*-Strom von HERG bei +40 mV um etwa 35% von 2,28  $\mu$ A ( $\pm$  0,23  $\mu$ A, *n* = 16) auf 1,49  $\mu$ A ( $\pm$  0,11  $\mu$ A, *n* = 22, *P* < 0,01) (Abb. 20). Nach Koexpression von Golgin-160 konnte jedoch in mehreren unabhängigen Experimenten keine statistisch signifikante Änderung des HERG-Stroms beobachtet werden (2,41  $\mu$ A,  $\pm$  0,16  $\mu$ A, *n* = 21). Weder GM130 noch Golgin-160 hatten einen Einfluß auf die Kinetik des HERG-Stroms.



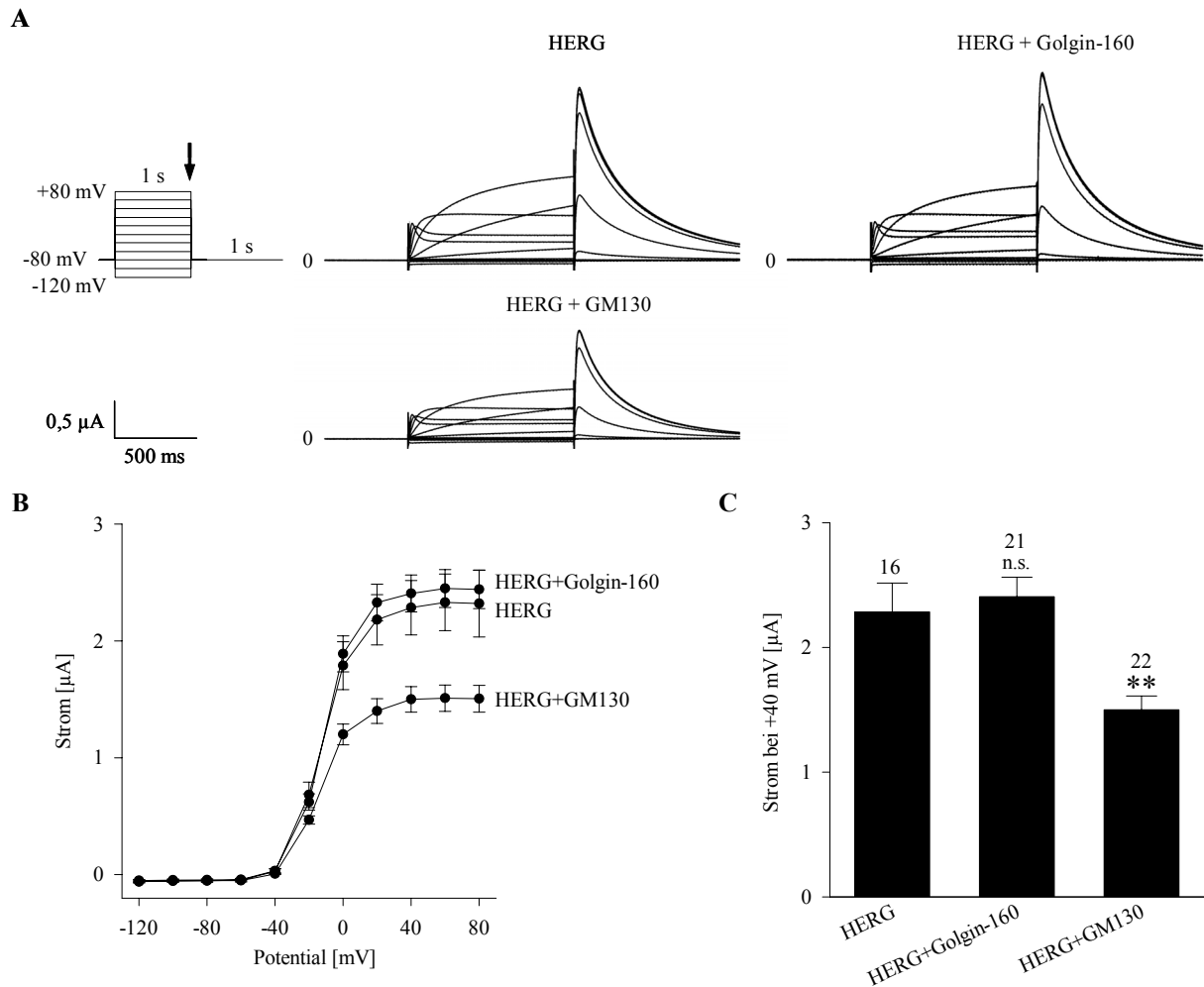


Abbildung 20: Effekt von Golgin-160 und GM130 auf den HERG-Strom. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 72 h nach Injektion von 9,24 ng HERG- und/oder 5,0 ng hGolgin-160- bzw. hGM130-cRNS. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt, der für die Datenanalyse verwendet wurde. *B*, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM) der *Tail*-Ströme. *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von +40 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur HERG exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben (n.s. = nicht signifikant).

Die Ergebnisse aus den elektrophysiologischen Untersuchungen der verschiedenen Kaliumkanäle sind in Abbildung 21 einander gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß der Effekt von Golgin-160 nicht auf die einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle ROMK und Kir2.1 beschränkt war, sondern daß auch die spannungsgesteuerten Kanäle Kv1.5 und Kv4.3 durch dieses Golgi-Protein stimuliert wurden. Der Befund, daß der HERG-Strom unverändert blieb, zeigte jedoch, daß die Überexpression von Golgin-160 nicht einen generellen, stimulatorischen Effekt auf die koexprimierten Ionenkanäle hat.

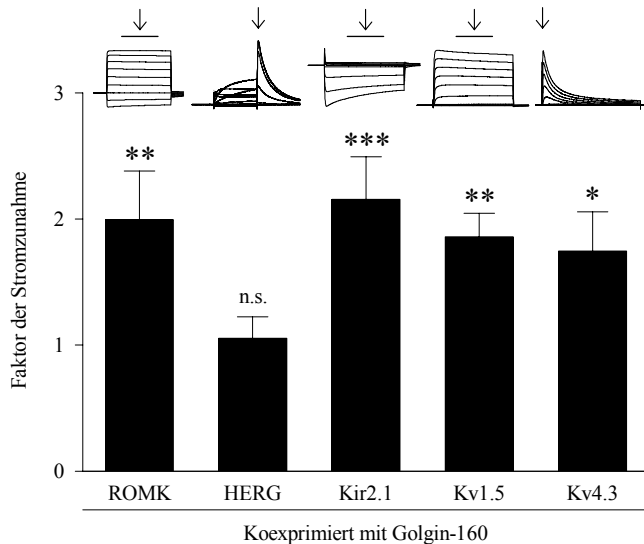


Abbildung 21: Einfluß von Golgin-160 auf die Stromamplituden von ROMK, HERG, Kir2.1, Kv1.5 und Kv4.3. Zusammenfassung der Abbildungen 15 und 16 sowie 18 bis 20. Die Fehlerbalken repräsentieren die Summe der normalisierten SEM vor und nach Koexpression mit Golgin-160. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu den Oozyten, die nur den jeweiligen Kanal exprimierten (n.s. = nicht signifikant). Über den Säulen sind repräsentative Stromkurven einzelner Oozyten gezeigt, die Golgin-160 und den jeweiligen Kanal exprimierten. Die Pfeile und Linien deuten den Zeitpunkt bzw. Zeitraum an, der für die Datenanalyse verwendet wurde.

### 3.4.4 Pharmakologische Untersuchungen

Pharmakologische Untersuchungen mit den bekannten ROMK-Blockern Barium (Zhou *et al.*, 1996) und Chinidin (Doi *et al.*, 1995) sollten im Folgenden bestätigen, daß die Stromzunahme durch die Wirkung von Golgin-160 auf ROMK und Kir2.1 begründet, und nicht durch endogene Kanäle vermittelt wurde. Außerdem sollte überprüft werden, ob Golgin-160 den Effekt dieser beiden Kaliumkanalblocker verändert. Zu diesem Zweck wurden Oozyten mit der jeweiligen cRNS injiziert.

Für die Messungen wurde ein vereinfachtes Spannungsprotokoll bestehend aus Testpulsen vom Ruhemembranpotential auf 0 mV bei ROMK bzw. -160 mV bei Kir2.1 verwendet. Die Oozyten wurden während der Strommessungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Bariumchlorid bzw. Chinidin perfundiert. Aus den gemessenen Amplituden wurde die Konzentration berechnet, die zur halbmaximalen Hemmung der Ströme notwendig war ( $IC_{50}$ ).

So inhibierte Barium den ROMK-Strom bei 0 mV mit einer  $IC_{50}$  von  $430 \mu\text{M}$  ( $\pm 25 \mu\text{M}$ ) (Abb. 22B). Nach Koexpression mit Golgin-160 änderte sich die  $IC_{50}$  nicht signifikant auf  $359 \mu\text{M}$  ( $\pm 28 \mu\text{M}$ ) (Abb. 22D). Für den Kir2.1-Strom wurde bei -160 mV für Barium eine  $IC_{50}$  von  $743 \mu\text{M}$  ( $\pm 192 \mu\text{M}$ ) bestimmt (Abb. 22F), die sich nach Koexpression mit Golgin-160 ebenfalls nicht signifikant auf  $713 \mu\text{M}$  ( $\pm 152 \mu\text{M}$ ) verringerte (Abb. 22H). Die  $IC_{50}$  der Hemmung von ROMK durch Chinidin betrug  $184 \mu\text{M}$  ( $\pm 15 \mu\text{M}$ ) (Abb. 22J) und nach Koexpression  $168 \mu\text{M}$  ( $\pm 21 \mu\text{M}$ ) (Abb. 22L). Die maximale Inhibition durch Barium wurde nach 2-3 min beobachtet (Abb. 22A, C, E, G), die von Chinidin dagegen erst nach 3-4 min (Abb. 22I, K). Es konnte keine Abhängigkeit der  $IC_{50}$ -Werte von der angelegten Spannung beobachtet werden. Außerdem war die Hemmung nach Auswaschen beider Substanzen vollständig reversibel (ohne Abbildung). Damit konnte gezeigt werden, daß Golgin-160 die Ströme der koexprimierten Kanalproteine und nicht endogene

Kaliumströme stimuliert. Die Resultate bestätigen gleichzeitig, daß sich die Aktivitäten der verwendeten Inhibitoren durch die Anwesenheit von Golgin-160 nicht änderten.

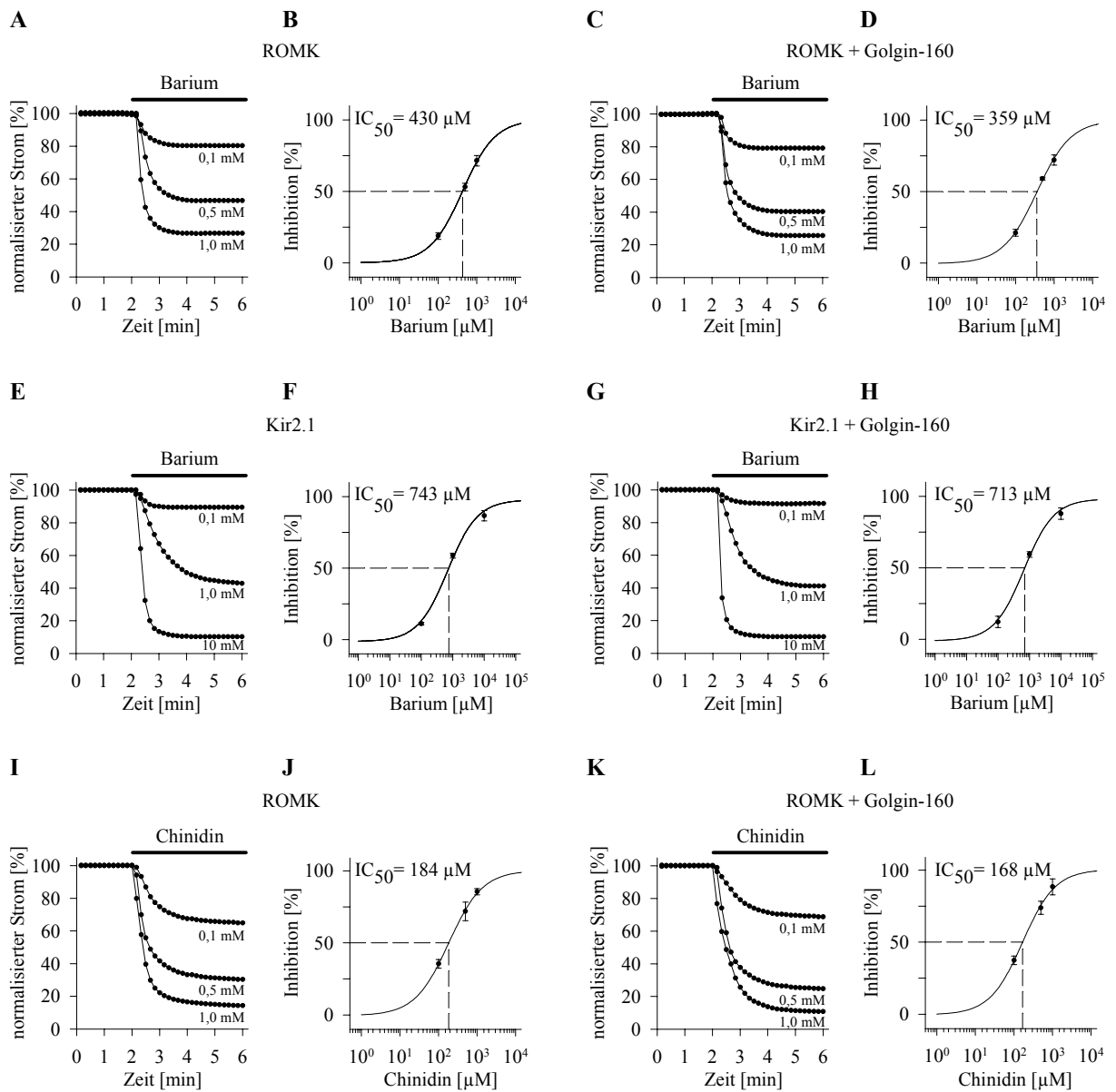


Abbildung 22: Hemmung der ROMK- und Kir2.1-Ströme durch Barium und Chinidin. Inhibition des ROMK-Stroms durch Barium (A-D) und Chinidin (I-L) bei einem Potential von 0 mV und 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2-cRNS und zusätzlich 1,15 ng hGolgin-160-cRNS. Inhibition des Kir2.1-Stroms durch Barium (E-H) bei einem Potential von -160 mV und 48 h nach Injektion von 0,1 ng hKir2.1-cRNS und zusätzlich 1,15 ng hGolgin-160-cRNS. Nur solche Oozyten wurden für die Messungen verwendet, die zwei Tage nach der Injektion einen Strom von nicht mehr als 2  $\mu$ A und nach Koexpression mit Golgin-160 eine Amplitude von maximal 5  $\mu$ A aufwiesen. Spalte 1 und 3, normalisierte Stromkurven vor und während der Perfusion mit Bariumchlorid bzw. Chinidin. Spalte 2 und 4, Dosis-Wirkungskurven (mittlere Inhibition  $\pm$  SD) nach vierminütiger Perfusion. Die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) erfolgte mit Hilfe des Hill-Modells aus den Mittelwerten von drei Oozyten je Konzentration und ohne Abzug der basalen Leitfähigkeit.

### 3.4.5 Oberflächenexpression

Um den Mechanismus der festgestellten Stromerhöhung näher zu untersuchen, wurde mit einer immunologischen Methode die Zelloberflächenexpression der Kir-Kanalproteine in *Xenopus laevis* Oozyten bestimmt (Zerangue *et al.*, 1999). Zu diesem Zweck wurde bei rROMK1 an Position 115 ein Hämagglutinin-Antigenepitop (ROMK-HA) (Abb. 23A) und bei hKir2.1 an Position 119 ein Protein C-Antigenepitop (Kir2.1-PC) (Abb. 25A) eingefügt. Der Nachweis der extrazellulären Epitope erfolgte mittels Chemolumineszenz. Diese wurde nach Inkubation der Oozyten mit den entsprechenden primären und Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern durch Umsatz eines Lumineszenzsubstrates gemessen. Die Werte der Oberflächenexpression wurden mit den gemessenen Stromamplituden und bei Kir2.1 zusätzlich mit der bestimmten Gesamtmenge an Protein verglichen. Die im Vergleich zum Wildtyp schwächere Stromexpression der Epitop-markierten Kanalproteine wurde durch eine größere Menge an injizierter cRNS (0,5 ng cRNS / Oozyte) ausgeglichen.

Zunächst wurde in elektrophysiologischen Voruntersuchungen bestätigt, daß die durch ROMK-HA verursachten Ströme dieselbe Einwärtsrektifizierung, Kinetik (Abb. 23B, C) und Sensitivität gegenüber Barium (ohne Abbildung) zeigten, wie der Wildtyp. Nach Koinjektion mit Golgin-160-cRNS konnte zwischen -120 mV bis +40 mV in mehreren unabhängigen Experimenten ebenfalls eine Erhöhung der ROMK-Stromamplitude beobachtet werden, die jedoch im Vergleich zum Wildtyp etwas schwächer ausfiel. Bei 0 mV erhöhte sich die mittlere Stromamplitude von 4,40  $\mu\text{A}$  ( $\pm 0,41 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) auf 6,39  $\mu\text{A}$  ( $\pm 0,48 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0,01$ ) (Abb. 23B, C, D).

Um eine mögliche Korrelation zwischen Stromamplitude und Oberflächenexpression zu untersuchen, wurden ROMK-HA sowie Golgin-160 jeweils alleine oder gemeinsam in Oozyten exprimiert. Ein Teil der Oozyten wurde für die Messung der Kaliumströme verwendet. Mit den restlichen Oozyten wurde der Oberflächenexpressionsassay durchgeführt. Als Kontrolle dienten Oozyten, die den ROMK-WT exprimierten, da diese im Vergleich zu nicht injizierten Oozyten ein geringeres Hintergrundsignal aufwiesen. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden dagegen nicht injizierte Oozyten als Kontrolle verwendet (Abb. 24).

Die Oberflächenexpression von ROMK erhöhte sich nach Koexpression mit Golgin-160 von 1,0 RLU/s ( $\pm 0,11 \text{ RLU/s}$ ,  $n = 24$ ) auf 3,5 RLU/s ( $\pm 0,39 \text{ RLU/s}$ ,  $n = 20$ ,  $P < 0,001$ ). Diese 3,5-fache Zunahme der Oberflächenexpression korrelierte mit der durchschnittlichen Verdopplung der Stromamplitude von 1,0  $\mu\text{A}$  ( $\pm 0,21 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) auf 2,1  $\mu\text{A}$  ( $\pm 0,41 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0,01$ ). Die Chemolumineszenzsignale von Oozyten, die nur Golgin-160 exprimierten (0,27 RLU/s,  $\pm 0,08 \text{ RLU/s}$ ,  $n = 12$ ) entsprachen denen der ROMK-WT-Kontrolle (0,30 RLU/s,  $\pm 0,07 \text{ RLU/s}$ ,  $n = 10$ ). Der Strom des ROMK-WT (0,82  $\mu\text{A}$ ,  $\pm 0,09 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) entsprach dem der Epitop-markierten Variante (Abb. 24).

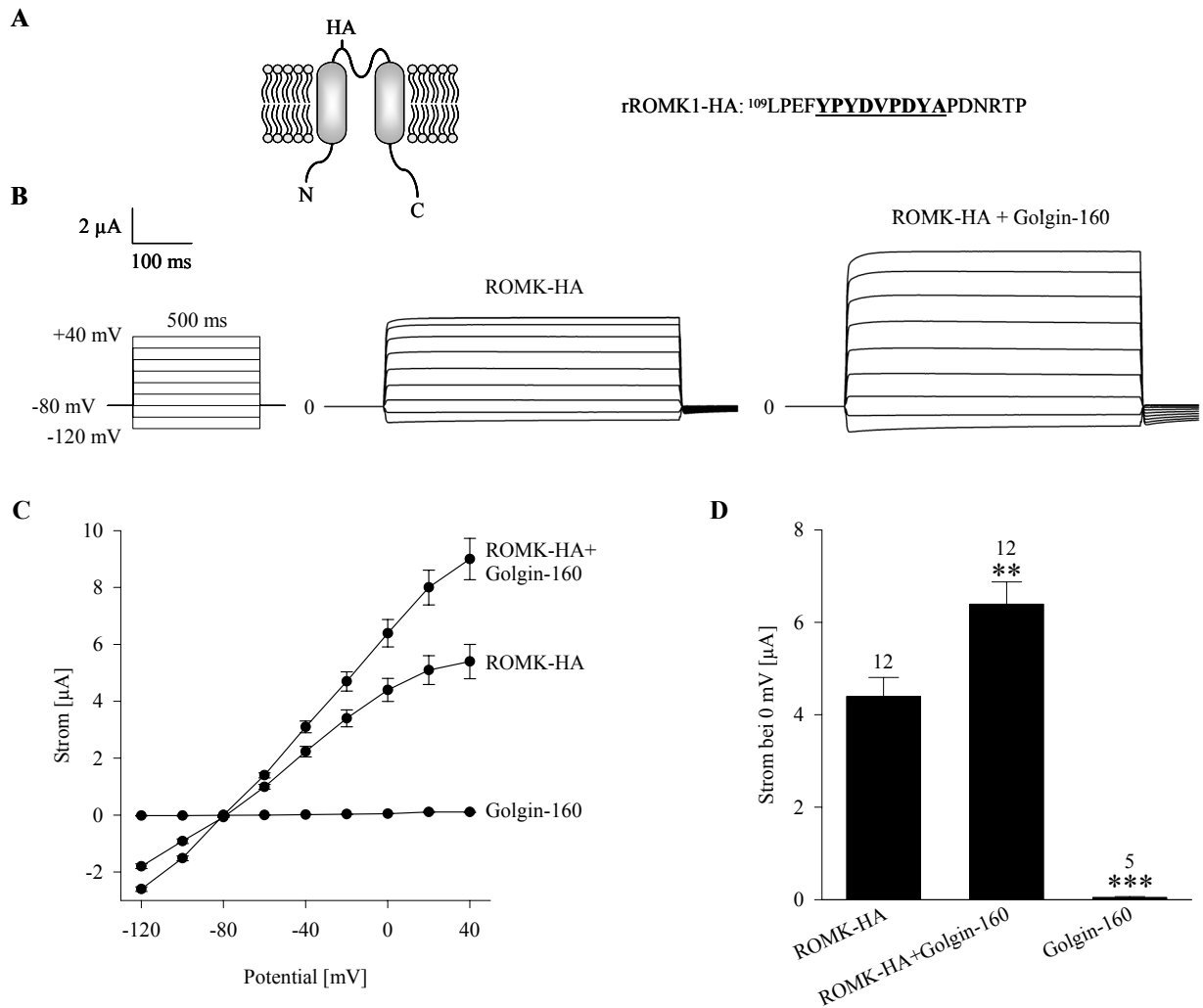


Abbildung 23: Effekt von Golgin-160 auf den Strom von ROMK-HA. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,5 ng rROMK1-HA- und/oder 1,15 ng hGolgin-160-cRNS. *A*, Topologie von ROMK-HA und Ausschnitt der Proteinsequenz. Das HA-Antigenepitop (unterstrichen) wurde extrazellulär an Position 115 eingefügt. *B*, Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *C*, Strom-Spannungskurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *D*, mittlere Stromamplituden aus *C* bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu den Oozyten, die nur ROMK-HA exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Auch nach Koexpression von Kir2.1 und Golgin-160 konnte eine Erhöhung der Zelloberflächenexpression beobachtet werden. Der Kir2.1-Strom nahm um das 2,2-fache ( $\pm$  0,24) zu, die Oberflächenexpression um das 1,8-fache ( $\pm$  0,08) zu. Ein gleichzeitig durchgeführter Western-Blot zeigte keine Veränderung der Gesamtmenge an Kir2.1-Protein nach Koexpression von Golgin-160 (Abb. 25).

Um den Einfluß von Golgin-160 auf den Transport anderer Membranproteine zu untersuchen, wurde es mit dem muskarinischen M2-Rezeptor koexprimiert und die Oberflächenexpression bestimmt. Die Anzahl der M2-Rezeptoren an der Zelloberfläche änderten sich nach Koexpression von Golgin-160 jedoch nicht (ohne Abbildung). Dieses Experiment wurde von Ioana Neagoe am ZMBH durchgeführt.

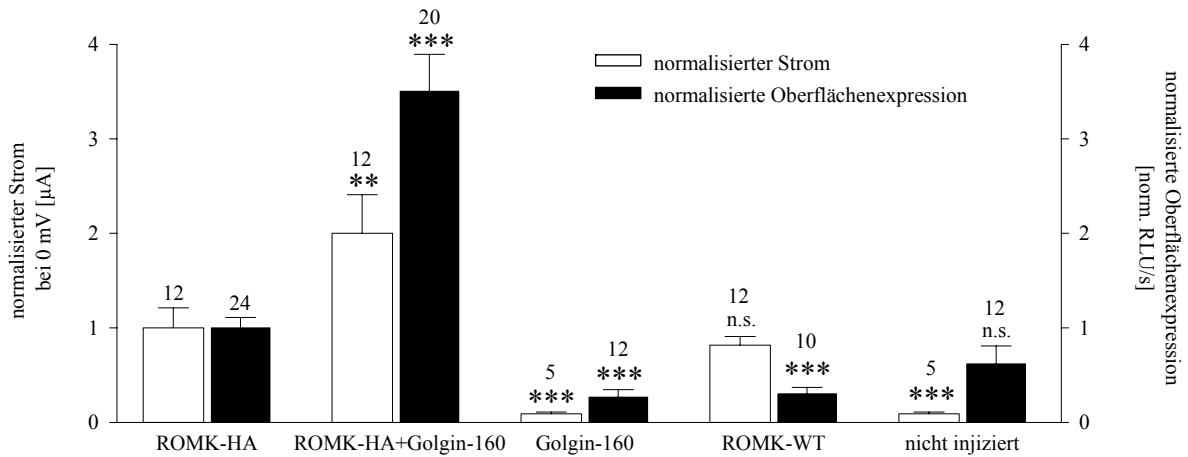


Abbildung 24: Effekt von Golgin-160 auf die Oberflächenexpression von ROMK. Repräsentative Messungen 48 h nach Injektion von 0,5 ng rROMK1-HA- und/oder 1,15 ng hGolgin-160-cRNS. Als Kontrollen dienten Oozyten, die mit 0,05 ng hROMK2-WT-cRNS injiziert wurden sowie nicht injizierte Oozyten. Weiße Säulen: Normalisierte Stromamplitude bei einem Potential von 0 mV. Schwarze Säulen: Normalisierte, relative Chemolumineszenzsignale als Maß für die Oberflächenexpression. Die Daten wurden parallel durch Zwei-Elektroden-Spannungsklemme sowie Chemolumineszenzassay ermittelt. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu ROMK-HA. Die Fehlerbalken zeigen SEM. Die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben (n.s. = nicht signifikant).

A hKir2.1-PC: <sup>113</sup>LDTSMSEDOVDPRLIDGKVSKA

B normalisierter Strom  
normalisierte Oberflächenexpression

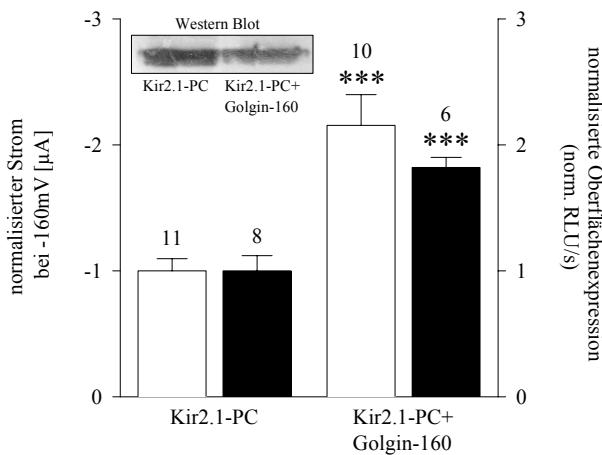


Abbildung 25: Effekt von Golgin-160 auf die Oberflächenexpression von Kir2.1. A, Ausschnitt der Proteinsequenz von hKir2.1 mit Protein C (PC)-Antigenepitop (unterstrichen). B, Messungen 48 h nach Injektion von 0,5 ng hKir2.1-PC- und zusätzlich 4,5 ng hGolgin-160-cRNS. Weiße Säulen: Normalisierte Stromamplitude bei einem Potential von -160 mV. Schwarze Säulen: Normalisierte, relative Chemolumineszenzsignale als Maß für die Oberflächenexpression. Die Daten wurden durch Zwei-Elektroden-Spannungsklemme sowie Oberflächenexpressionsanalyse ermittelt. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kir2.1-PC. Die Fehlerbalken zeigen SEM. Die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben. Der Western-Blot zeigt das PC-markierte Protein aus Oozytenhomogenaten. Oberflächenexpressionsassay und Western-Blot wurden von Ioana Neagoe am ZMBH durchgeführt.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß Golgin-160 die Dichte der ROMK- und Kir2.1-Kanalproteine an der Zelloberfläche erhöht und so die Zunahme der Stromamplitude verursacht. Eine allgemeine Steigerung der Proteinbiosynthese durch Golgin-160 war dagegen auszuschließen, da die Gesamtmenge an Kir2.1-Protein etwa gleich blieb.

### 3.4.6 Vergleich der Wirkungen von Golgin-160 und GM130

In der Literatur wurde beschrieben, daß die Überexpression des Golgi-Proteins GM130 (Fritzler *et al.*, 1993) den HERG-Kaliumstrom in Oozyten hemmt (Roti Roti *et al.*, 2002). Entsprechend den Ergebnissen von Roti Roti und Mitarbeitern (2002) erniedrigte GM130 in unseren Experimenten den mittleren *Tail*-Strom von HERG bei +40 mV um etwa 35% (Abb. 20). Die Koexpression des HERG-Kanalproteins mit Golgin-160, die bereits in Abschnitt 3.4.3 beschrieben wurde, zeigte dagegen keine Wirkung des Golgi-Proteins auf HERG. Um die mögliche Wirkung von GM130 auf den ROMK-Strom zu untersuchen, wurden entsprechende Koexpressionsstudien in Oozyten durchgeführt (Abb. 26).

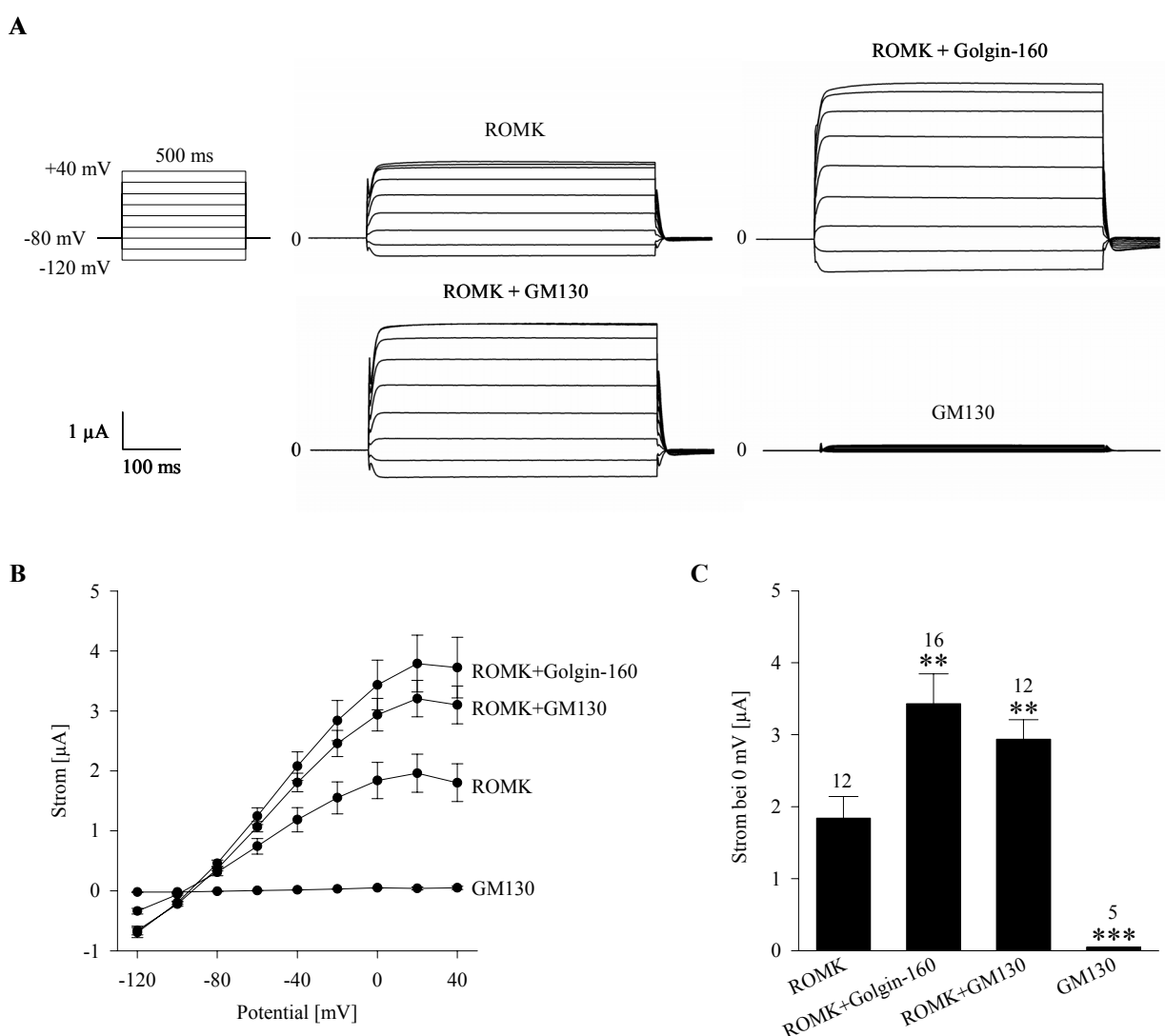


Abbildung 26: Effekt von Golgin-160 und GM130 auf den ROMK-Strom. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und/oder 5,0 ng hGolgin-160- bzw. GM130-cRNS. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *B*, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu den Oozyten, die nur ROMK exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Dabei zeigte das koexprimierte GM130 auf ROMK eine gegensätzliche Wirkung als auf HERG. In einem repräsentativen Experiment stieg die mittlere Stromamplitude um das 1,6-fache von  $1,84 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,30 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) auf  $2,94 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,27 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0,01$ ) an, während Golgin-160 gleichzeitig den ROMK-Strom um das 1,9-fache auf  $3,43 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,41 \mu\text{A}$ ,  $n = 16$ ,  $P < 0,01$ ) erhöhte. Wie Golgin-160 erzeugte auch GM130 alleine keinen Strom (Abb. 26). Die unterschiedlichen Wirkungen beider Golgi-Proteine auf HERG und ROMK legten nahe, daß Golgin-160 und GM130 unterschiedliche Rollen beim Transport von ROMK und HERG an die Zelloberfläche spielen.

### 3.4.7 Bindungsstudien mit ausgewählten ROMK-Bartter-Mutanten

Mutationen im ROMK-Protein, die einen Funktionsverlust des Ionenkanals hervorrufen, führen zum Bartter-Syndrom Typ II (Bartter *et al.*, 1962). Bestimmte Mutationen bewirken einen Defekt beim Transport des Kanals an die Zelloberfläche (Peters *et al.*, 2003). Um die Möglichkeit zu untersuchen, daß der krankheitsverursachende Defekt beim Membrantransport dieser Mutationen auf eine gestörte Interaktion des ROMK-Proteins mit Golgin-160 zurückzuführen ist, wurden Bindungsstudien mit Golgin-160 und zehn C-terminalen Bartter-Mutanten durchgeführt.

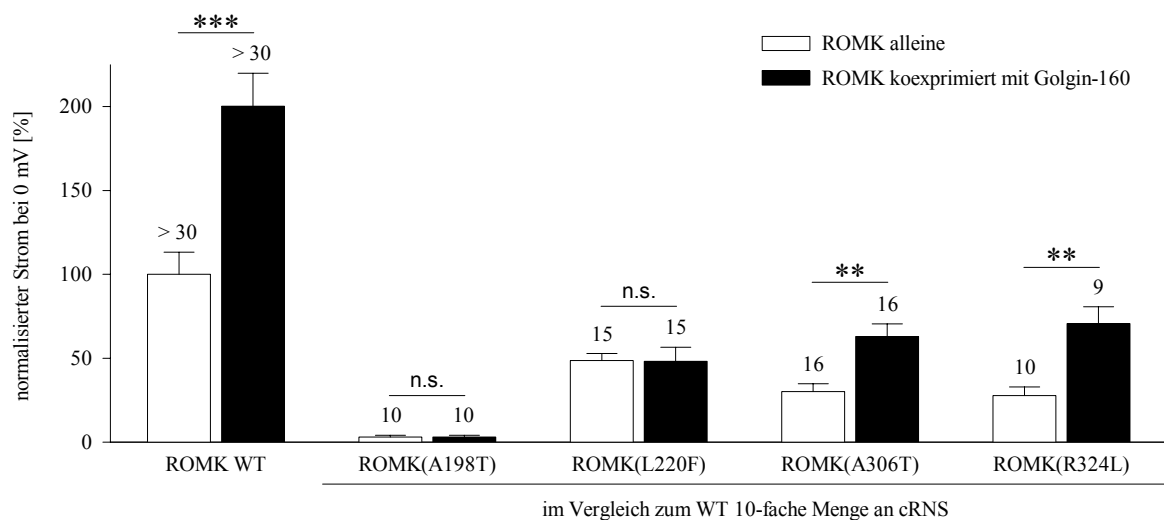


Abbildung 27: Effekt von Golgin-160 auf die Ströme von ROMK-Mutanten. Repräsentative Messungen der Kaliumströme mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme 48 h nach Injektion von  $0,05 \text{ ng}$  hROMK2WT- bzw.  $0,5 \text{ ng}$  der hROMK2-Mutanten-cRNS und  $1,15 \text{ ng}$  hGolgin-160-cRNS. Normalisierte Stromamplituden (Mittelwerte  $\pm$  SEM) bei einem Potential von  $0 \text{ mV}$ . Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur den Kanal exprimierten. Die Anzahl ( $n$ ) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben (n.s. = nicht signifikant).

Bei den untersuchten Mutanten handelte es sich um Punktmutationen und C-terminale Trunktionsmutationen. Mit Ausnahme der Punktmutation R311W, die die pH-Abhängigkeit von ROMK beeinflusst (Schulte *et al.*, 1999), verhindern die übrigen sieben Punktmutanten A198T, L220F, A306T, Y314C, L320P, R324L, F325C und zwei Trunktationen 362X und 368X, denen die letzten 29



bzw. 23 Aminosäuren fehlen, den Transport von ROMK an die Plasmamembran in *Xenopus* Oozyten und Säugerzellen. Aufgrund des defekten Membrantransports erzeugten diese Mutanten auch keine funktionellen Ströme mehr. Nach starker Überexpression, durch Injektion der zehnfachen Menge an cRNS, konnten in Oozyten aber für vier Punktmutanten (A198T, L220F, A306T, R324L) wieder Kaliumströme gemessen werden (Peters *et al.*, 2003).

Alle zehn untersuchten Punkt- bzw. Trunktationsmutanten zeigten in einem durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Assay noch Interaktionen mit dem Golgin-160(614-849)-Beutefragment (ohne Abbildung). In Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten (Peters *et al.*, 2003), konnten in unseren Untersuchungen wurden nach Injektion der normalen Menge an cRNS bei allen zehn untersuchten Mutanten keine Ströme gemessen (ohne Abbildung). Wie beschrieben waren aber nach Injektion der zehnfachen Menge cRNS der ROMK-Mutanten L220F, A306T und R324L wieder Kaliumströme meßbar (Abb. 27). Für ROMK(A198T) konnten jedoch nach wie vor keine Ströme nachgewiesen werden. Die ROMK(L220F)-Mutante erzeugte im Mittel etwa 50% des Wildtyp-Stroms, bei ROMK(A306T) und ROMK(R324L) entsprach die resultierende Stromamplitude etwa 30% des Wildtyps (Abb. 27). Für zwei der untersuchten Mutanten, nämlich ROMK(A306T) und ROMK(R324L) konnte eine zusätzliche Stimulation durch das koexprimierte Golgin-160 beobachtet werden. Die durchschnittliche Stromamplitude von ROMK(A306T) stieg nach Koexpression mit Golgin-160 um das 2,1-fache auf gut 60%, die Stromamplitude von ROMK(R324L) erhöhte sich um das 2,5-fache auf 70% des Wildtyp-Stroms (Abb. 27). Damit war das Ausmaß der Stimulation beider Mutanten ähnlich groß wie beim ROMK-Wildtyp. Diese funktionelle Interaktion bestätigte auch die Ergebnisse der Bindungsstudien in der Hefe. Obwohl die Mutante L220F Golgin-160 noch binden konnte, hatte dies in Oozyten keine Zunahme der Stromamplitude zur Folge.

### 3.4.8 Regulation von Golgin-160 durch SGK1

Golgin-160 wurde ursprünglich als Phosphoprotein beschrieben (Misumi *et al.*, 1997). Inzwischen wurde die Phosphorylierung der N-terminalen Kopfdomäne durch die MLK3 (*Mixed-Lineage-Kinase-3*) gezeigt (Cha *et al.*, 2004), die bei Überexpression in Säugerzellen die Caspase-abhängige Zerteilung der Kopfdomäne von Golgin-160 während der Apoptose stimuliert (Mancini *et al.*, 2000) und so vermutlich die Auflösung der Golgi-Struktur während des programmierten Zelltodes fördert (Cha *et al.*, 2004).

Durch Analyse der Golgin-160-Proteinsequenz wurden an den Positionen 389 und 878 zwei Serine identifiziert (Abb. 6), die Teil der Konsensussequenz RXXRXX(S/T) der Kinasen PKA und SGK1 sind (Webster *et al.*, 1993; Waldegger *et al.*, 1997). Um einen möglichen Einfluß von SGK1, die auch an der Regulation der ROMK-Kanalaktivität beteiligt ist (Yoo *et al.*, 2003, 2005; O'Connell

*et al.*, 2005), auf die Funktion von Golgin-160 zu untersuchen, wurden Koexpressionen in Oozyten durchgeführt. Dafür wurden die SGK1-WT, die konstitutiv-aktive Mutante SGK1(S422D) und die dominant-negative Doppelmutante SGK1(T256A/S422A) verwendet (Abb. 28).

In dem in Abbildung 28 dargestellten Experiment wurde der ROMK-Strom nach Koexpression mit Golgin-160 von  $1,00 (\pm 0,09 \mu\text{A}, n=20)$  auf  $1,44 \mu\text{A} (\pm 0,14 \mu\text{A}, n=20, P < 0,001)$  erhöht. Nach zusätzlicher Expression der SGK1-WT oder der konstitutiv-aktiven Mutante SGK1(S422D) wurde eine Hemmung der Stromamplituden auf  $1,2 \mu\text{A} (\pm 0,13 \mu\text{A}, n=12)$ , nicht signifikant bzw.  $0,99 \mu\text{A} (\pm 0,07 \mu\text{A}, n=20, P < 0,01)$  beobachtet. Diese Ergebnisse deuten an, daß die Koexpression der SGK1 einen hemmenden Effekt auf die Funktion von Golgin-160 hat. Allerdings wurde auch nach Koexpression der dominant-negativen Mutante SGK1(T256A/S422A) ein etwas geringerer Strom von  $1,12 \mu\text{A} (\pm 0,10 \mu\text{A}, n=20, P < 0,05)$  aufgezeichnet (Abb. 28). Bei einer hemmenden Wirkung der SGK1 wäre in diesem Fall aber eher eine Stromzunahme als eine Reduktion zu erwarten gewesen.

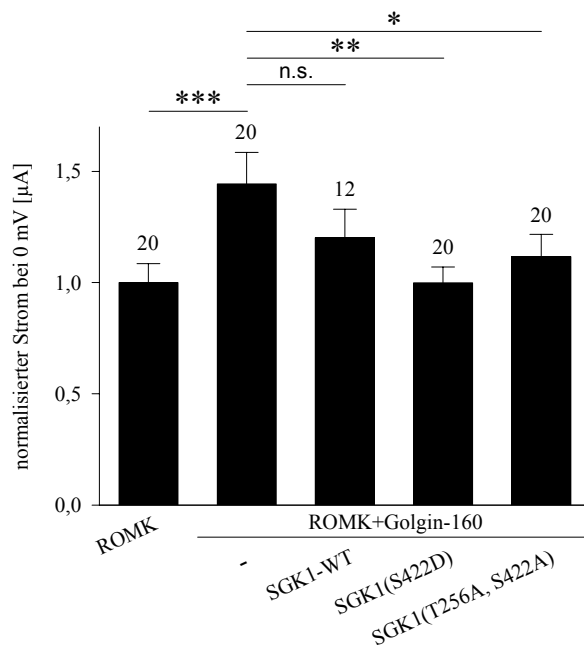


Abbildung 28: Einfluß der humanen Serum- und Glukokortikoid-sensitiven Kinase (hSGK1) auf den Effekt von Golgin-160. Repräsentative Messungen der Kaliumströme mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme 60 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und 1,15 ng Golgin-160-cRNS je Oozyte. Zusätzlich wurden 5,0 ng cRNS der humanen SGK1-WT, der konstitutiv-aktiven Mutante SGK1(S422D) oder der dominant-negativen Mutante SGK (T256A/S422A) injiziert. Normalisierte Stromamplituden (Mittelwerte  $\pm$  SEM) bei einem Potential von 0 mV. Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur ROMK und Golgin-160 exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben (n.s. = nicht signifikant).

### 3.5 Charakterisierung weiterer Interaktionspartner von ROMK

Nach dem gelungenen Nachweis der funktionellen Interaktion von Golgin-160 mit dem ROMK-Protein wurden nun weitere gefundene Interaktionspartner von ROMK untersucht. Für diese Untersuchungen wurden PP2A B56 $\beta$  und GRB7 (Signaltransduktion), NRF2 und CDR62 (Transkriptionsfaktoren) sowie C13orf22 und TNRC5 (unbekannte Funktion) ausgewählt und zusammen mit ROMK in Oozyten exprimiert.

### 3.5.1 PP2A B56 $\beta$

Die Ergebnisse der Koexpression von ROMK und der Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A B-Untereinheit 56 $\beta$  (PP2A B56 $\beta$ ; McCright & Virshup, 1995) sind in Abbildung 29 dargestellt.

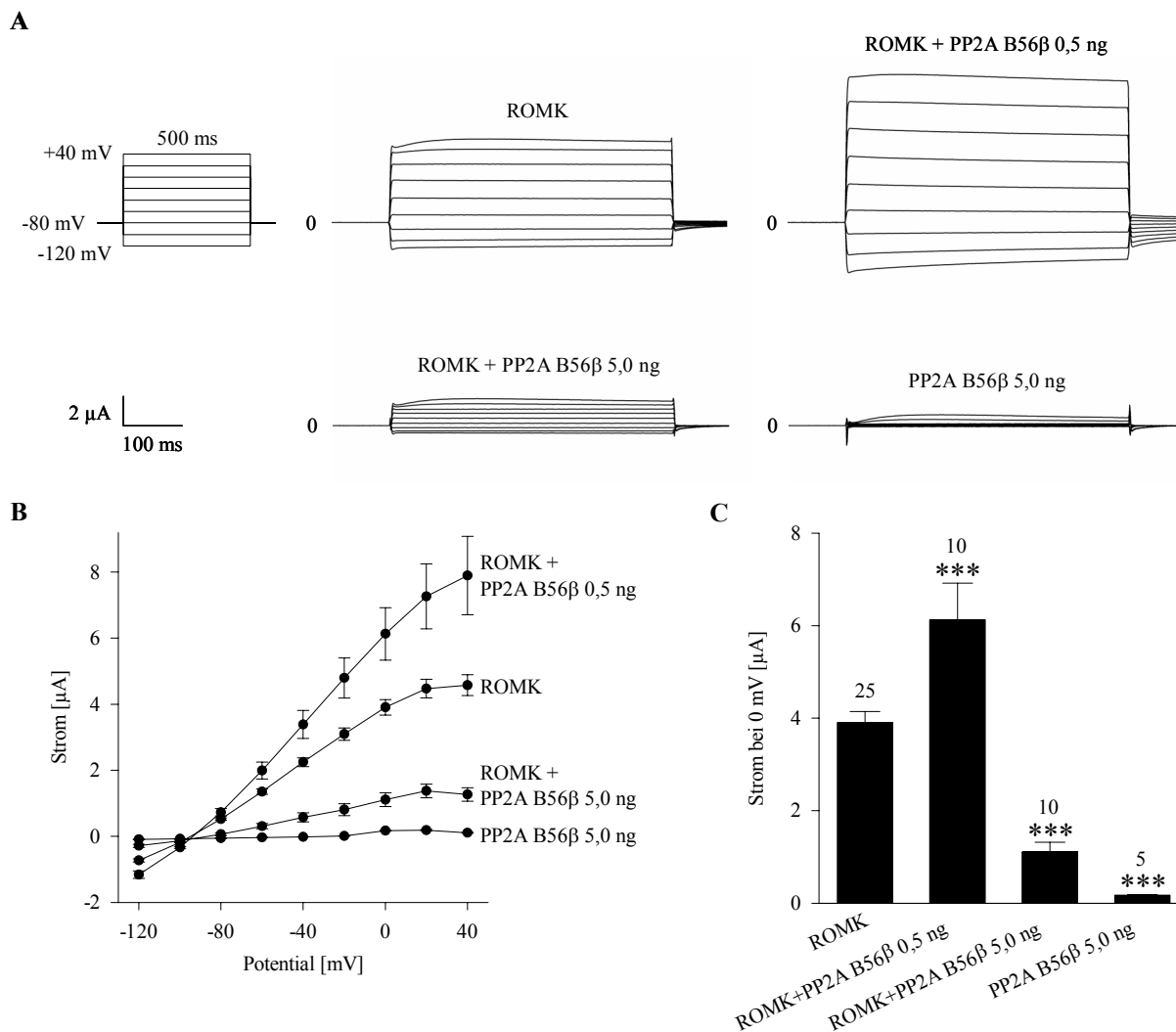


Abbildung 29: Konzentrationsabhängige Wirkung von PP2A B56 $\beta$  auf ROMK. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und/oder 0,5 ng und 5,0 ng hPP2A B56 $\beta$ -cRNS. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *B*, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur ROMK exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Bereits die Koinjektion einer kleinen Menge cRNS dieser regulatorischen Untereinheit (0,5 ng cRNS / Oozyte) bewirkte zwischen -120 mV und +40 mV eine signifikante Erhöhung des ROMK-Stroms. So war bei 0 mV die Stromamplitude signifikant um 57% von 3,91  $\mu$ A ( $\pm$  0,24  $\mu$ A, *n* = 25) auf 6,13  $\mu$ A ( $\pm$  0,79  $\mu$ A, *n* = 10, *P* < 0,001) erhöht. Dagegen resultierte die Koinjektion der zehnfachen Menge (5,0 ng cRNS / Oozyte) in einer Reduktion um 72% auf 1,11  $\mu$ A ( $\pm$  0,21  $\mu$ A, *n* = 10, *P* < 0,001) ein. PP2A B56 $\beta$  allein erzeugte keinen Strom. Die Kinetik des ROMK-Stroms

wurde durch die Phosphatase-Untereinheit nicht beeinflusst (Abb. 29A, B). PP2A B56 $\beta$  zeigte demnach in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an cRNS einen gegenläufigen Effekt auf die Aktivität des ROMK-

### 3.5.2 GRB7

Die Ergebnisse der Koexpression von ROMK und des Adapterproteins GRB7 (*Growth factor Receptor Bound protein 7*; Margolis *et al.*, 1992) sind in Abbildung 30 dargestellt.

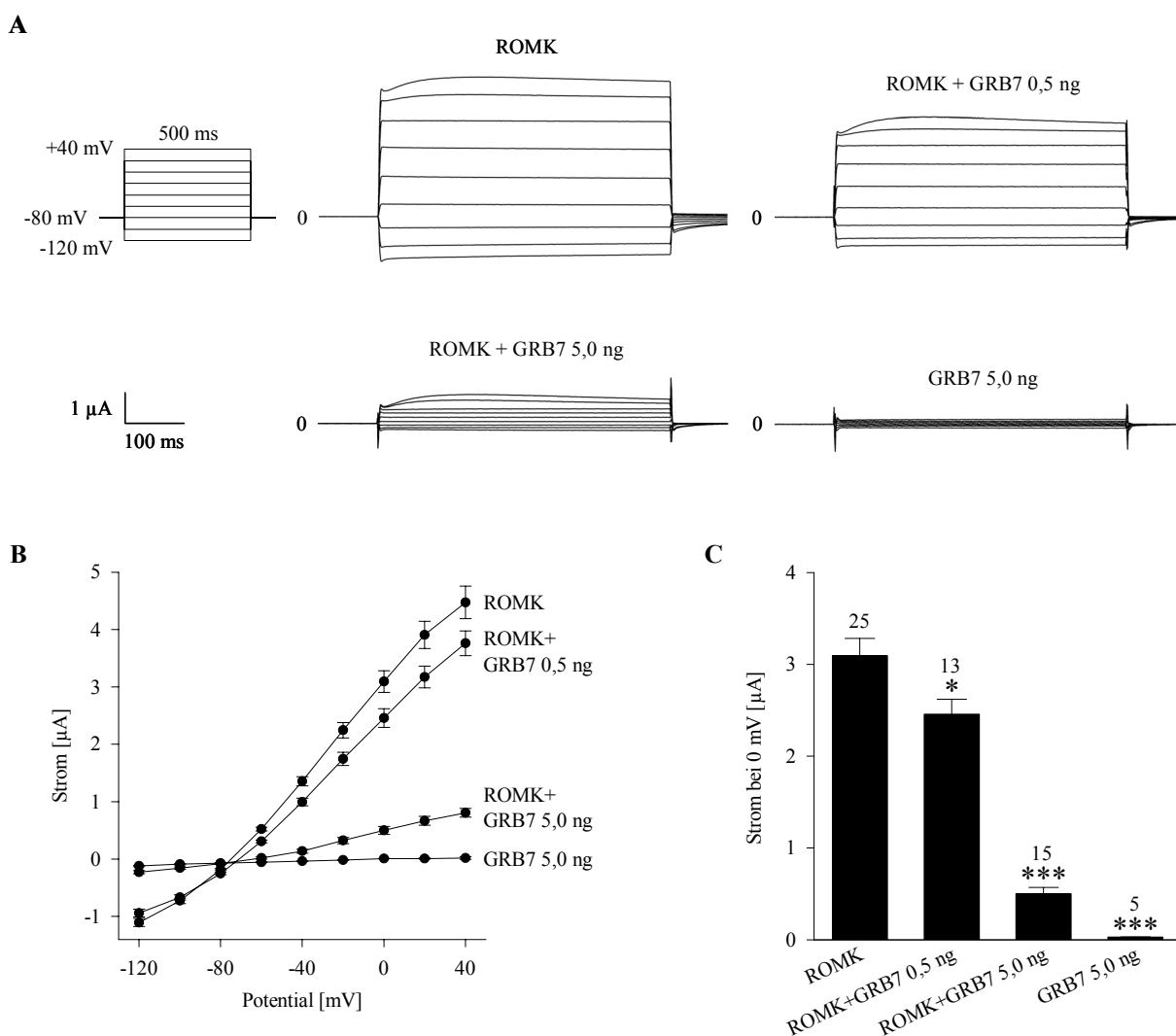


Abbildung 30: Konzentrationsabhängige Wirkung von GRB7 auf ROMK. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und/oder 0,5 ng und 5,0 ng hGRG7-cRNS. *A*, verwendetes Spannungsprotokoll und repräsentative Stromverläufe. *B*, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM). *C*, mittlere Stromamplituden aus *B* bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur ROMK exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben.

Die durchschnittliche ROMK-Stromamplitude von 3,09  $\mu$ A ( $\pm$  0,19  $\mu$ A, *n* = 25) verringerte sich nach Koinjektion von 0,5 ng GRB7-cRNS signifikant um gut 20% auf 2,46  $\mu$ A ( $\pm$  0,16  $\mu$ A,

$n = 13$ ,  $P < 0,05$ ). Nach Koinjektion der zehnfachen Menge an GRB7-cRNS (5,0 ng cRNS / Oozyte) wurde eine Abnahme des ROMK-Stroms um mehr als 80% auf  $0,51 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,07 \mu\text{A}$ ,  $n = 15$ ,  $P < 0,001$ ) festgestellt. GRB7 allein erzeugte keine Ströme und bewirkte auch keine Änderungen in der Kinetik des koexprimierten ROMK-Stroms (Abb. 30).

Um diesen Effekt von GRB7 näher zu charakterisieren, wurde GRB7 mit den Kanälen der Kir2-Familie koexprimiert und seine Wirkung mit den verwandten Adapterproteinen GRB2 und GRB10 verglichen. GRB7 und GRB10 sind Mitglieder derselben Proteinfamilie, während GRB2 zu einer anderen GRB-Familie gehört (Han *et al.*, 2001). In Abbildung 31 sind die gemessenen Ströme sowie die abgeleiteten Strom-Spannungs-Kurven dargestellt. Es handelt sich bei diesen Daten um die normalisierten Mittelwerte mehrerer unabhängiger Messungen mit unterschiedlichen Präparationen an cRNS und Oozyten.

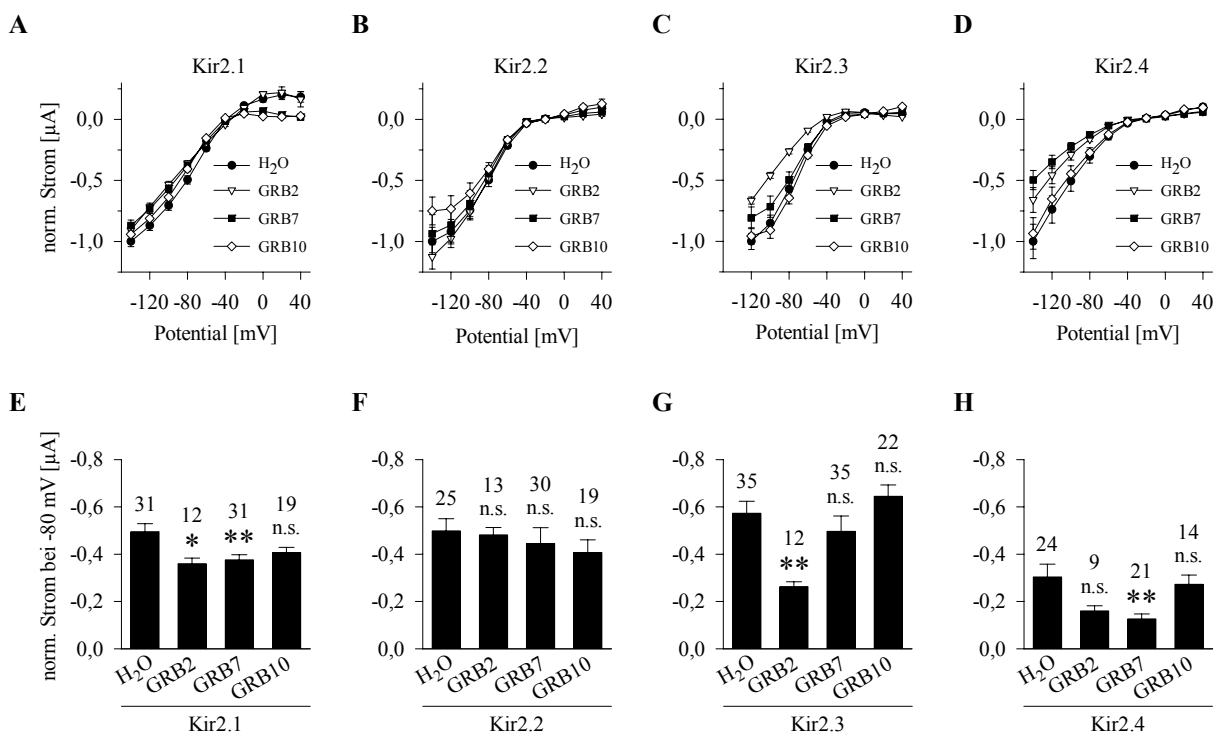


Abbildung 31: Wirkung von GRB2, GRB7 und GRB10 auf die Ströme verschiedener Kir2.0-Kanäle. Die Messungen erfolgten 48 h nach Injektion von 0,3 ng (Kir2.1, Kir2.2) bzw. 1,0 ng (Kir2.3, Kir2.4) und 5,0 ng cRNS von GRB2, GRB7 und GRB10. Mit Wasser injizierte Oozyten dienten als Kontrolle. A-D, normalisierte Strom-Spannungs-Kurven. E-H, normalisierte mittlere Stromamplituden bei einem Potential von -80 mV. Die Kontrollströme (ohne GRB) wurden auf die bei -140 mV (Kir2.1, Kir2.2, Kir2.4) bzw. -120 mV (Kir2.3) gemessenen Werte normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) mehrerer unabhängiger Messungen mit unterschiedlichen Präparationen an cRNS und Oozyten. Diese Messungen wurden von Guiscard Seeborn am Physiologischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Expression der verschiedenen Kir2-Kanäle führte bereits nach zwei Tagen zu charakteristischen stark einwärtsgerichteten Kaliumströmen (Abb. 31A-D). Bei -80 mV wurde für Kir2.1 ein mittlerer Strom von  $-0,50 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,03 \mu\text{A}$ ,  $n = 31$ ) ermittelt. Nach Koexpression mit

GRB2 verringerte sich dieser Wert signifikant um 25% auf  $-0,36 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0,05$ ) und nach Koexpression von GRB7 auf  $-0,38 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 31$ ,  $P < 0,01$ ). GRB10 hemmte dagegen den Kir2.1-Strom nicht ( $-0,41 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 19$ ) (Abb. 31A, E).

Für Kir2.2 wurde bei  $-80 \text{ mV}$  ein mittlerer Strom von  $-0,49 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,05 \mu\text{A}$ ,  $n = 25$ ) bestimmt. Nach Koexpression von GRB2 ( $-0,48 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,03 \mu\text{A}$ ,  $n = 13$ ), GRB7 ( $-0,45 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,07 \mu\text{A}$ ,  $n = 30$ ) und GRB10 ( $-0,41 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,05 \mu\text{A}$ ,  $n = 19$ ) konnten keine signifikanten Änderungen der gemessenen Ströme beobachtet werden (Abb. 31B, F).

Der Kir2.3-Strom war nach Koexpression mit GRB2 signifikant um 54% von  $-0,57 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,05 \mu\text{A}$ ,  $n = 35$ ) auf  $-0,26 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ,  $P < 0,01$ ) verringert. GRB7 ( $-0,50 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,06 \mu\text{A}$ ,  $n = 35$ ) und GRB10 ( $-0,64 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,05 \mu\text{A}$ ,  $n = 22$ ) hatten keinen signifikanten Einfluß auf die gemessenen Ströme (Abb. 31C, G).

Nach Injektion der Kir2.4-cRNS wurde eine mittlere Stromamplitude von  $-0,30 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,05 \mu\text{A}$ ,  $n = 24$ ) bestimmt. Nur die Koexpression von GRB7 führte zu einer signifikanten Reduktion des Stroms um 57% auf  $-0,13 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 21$ ,  $P < 0,01$ ). GRB2 ( $-0,16 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 9$ ) und GRB10 ( $-0,27 \mu\text{A}$ ,  $\pm 0,04 \mu\text{A}$ ,  $n = 14$ ) veränderten den Kir2.4-Strom nicht (Abb. 31D, H).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß GRB7, das als Interaktionspartner von ROMK identifiziert wurde, neben ROMK (Abb. 30) auch die Kir2.1- und Kir2.4-Ströme signifikant hemmte, aber die Kanalaktivität von Kir2.2 und Kir2.3 unbeeinflußt ließ (Abb. 31). GRB2 wiederum hemmte die Ströme von Kir2.1 und Kir2.3, nicht aber die von Kir2.2 und Kir2.4, während GRB10 in keiner dieser Koexpressionen einen Effekt auf die Kir2-Ströme ausübte.

### 3.5.3 NRF2 & CDR62

Die Koexpressionen der Transkriptionsfaktoren NRF2 (Nuclear factor (Erythroid-derived 2)-like 2) (Moi *et al.*, 1994) und CDR62 (Cerebellar degeneration-related 2) (Fathallah-Shaykh *et al.*, 1991) mit ROMK sind in Abbildung 32 dargestellt. Bei den untersuchten Membranspannungen zwischen  $-120 \text{ mV}$  bis  $+40 \text{ mV}$  war keine Wirkung auf den ROMK-Strom sichtbar. Der durchschnittliche ROMK-Strom bei  $0 \text{ mV}$  betrug  $1,51 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,15 \mu\text{A}$ ,  $n = 10$ ) und blieb nach Koexpression mit NRF2 mit  $1,61 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,14 \mu\text{A}$ ,  $n = 16$ ) nahezu unverändert (Abb. 32A, B). In den dargestellten Untersuchungen mit CDR62 ergab sich für ROMK ein Strom von  $7,53 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,96 \mu\text{A}$ ,  $n = 13$ ) und nach Koexpression einer von  $7,38 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,68 \mu\text{A}$ ,  $n = 13$ ) (Abb. 32C, D). Die Expression von NRF2 und CDR62 allein erzeugte keine Ströme.

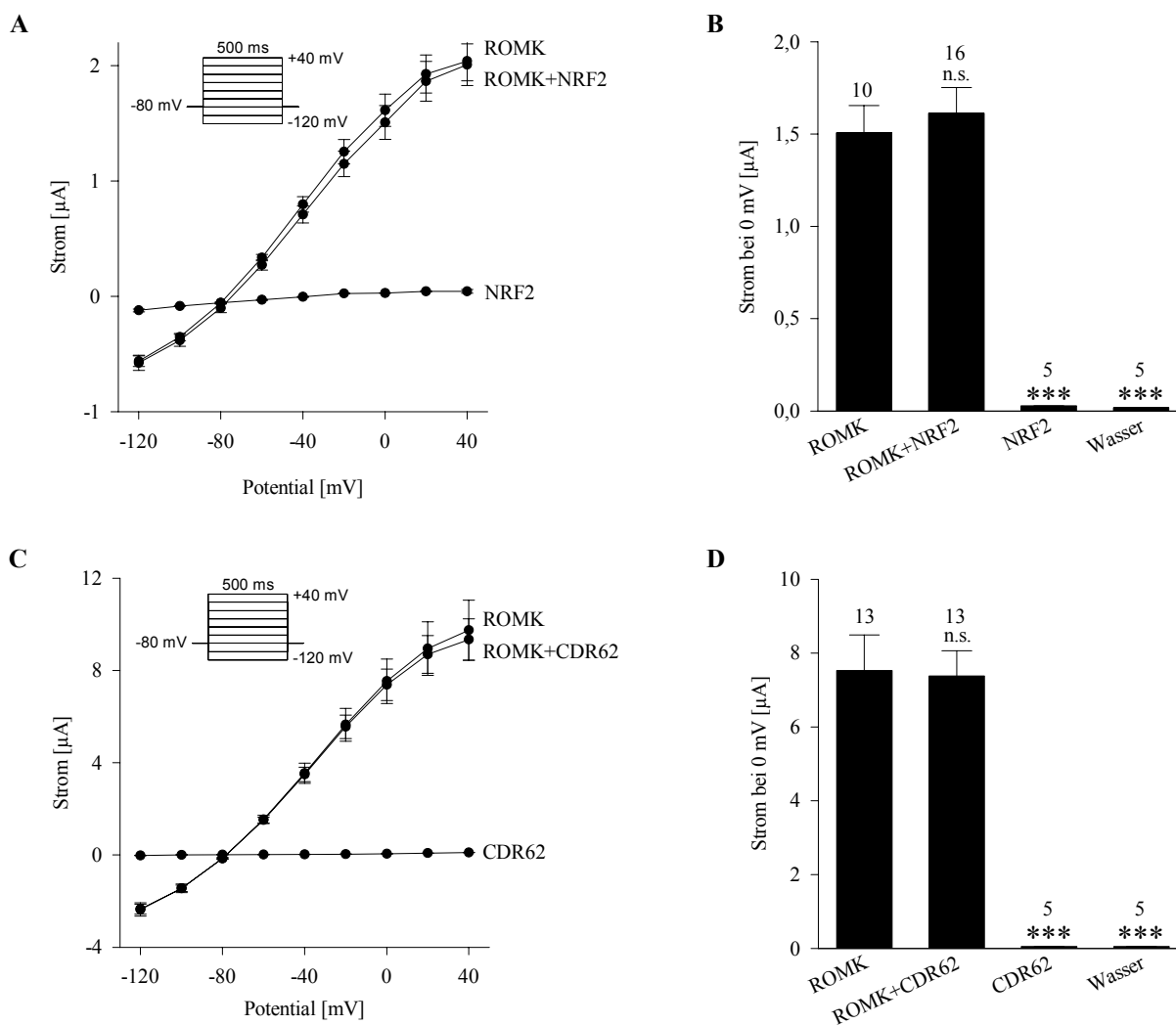


Abbildung 32: Koexpression von ROMK mit NRF2 oder CDR62. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und/oder 5,0 ng NRF2- (A, B) bzw. CDR62- (C, D) cRNS. A und C, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM) sowie verwendetes Spannungsprotokoll. B und D, mittlere Stromamplituden aus A und C bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur ROMK exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben (n.s. = nicht signifikant).

### 3.5.4 Proteine mit unbekannter Funktion

Die Untersuchungen mit C13orf22 (Chromosom 13, Leserahmen 22) und TNRC5 (Tri-Nucleotide Repeat Containing 5), deren Funktion bisher noch nicht aufgeklärt wurde, ergaben nach Koexpression in Oozyten ebenfalls keine Hinweise auf einen direkten Einfluß auf die ROMK-Aktivität. In dem vorliegenden Experiment wurde bei 0 mV für ROMK eine durchschnittliche Stromamplitude von  $6,67 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,76 \mu\text{A}$ ,  $n = 16$ ) bestimmt. Nach Koexpression mit C13orf22 wurden  $6,83 \mu\text{A}$  ( $\pm 0,98 \mu\text{A}$ ,  $n = 16$ ) und mit TNRC5  $5,84 \mu\text{A}$  ( $\pm 1,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 11$ ) gemessen (Abb. 33A-D). Die geringen Unterschiede waren nicht signifikant. Oozyten, die nur C13orf22 oder TNRC5 exprimierten, waren in ihrer Leitfähigkeit von denen mit Wasser injizierten Kontrolloozyten nicht unterscheidbar.

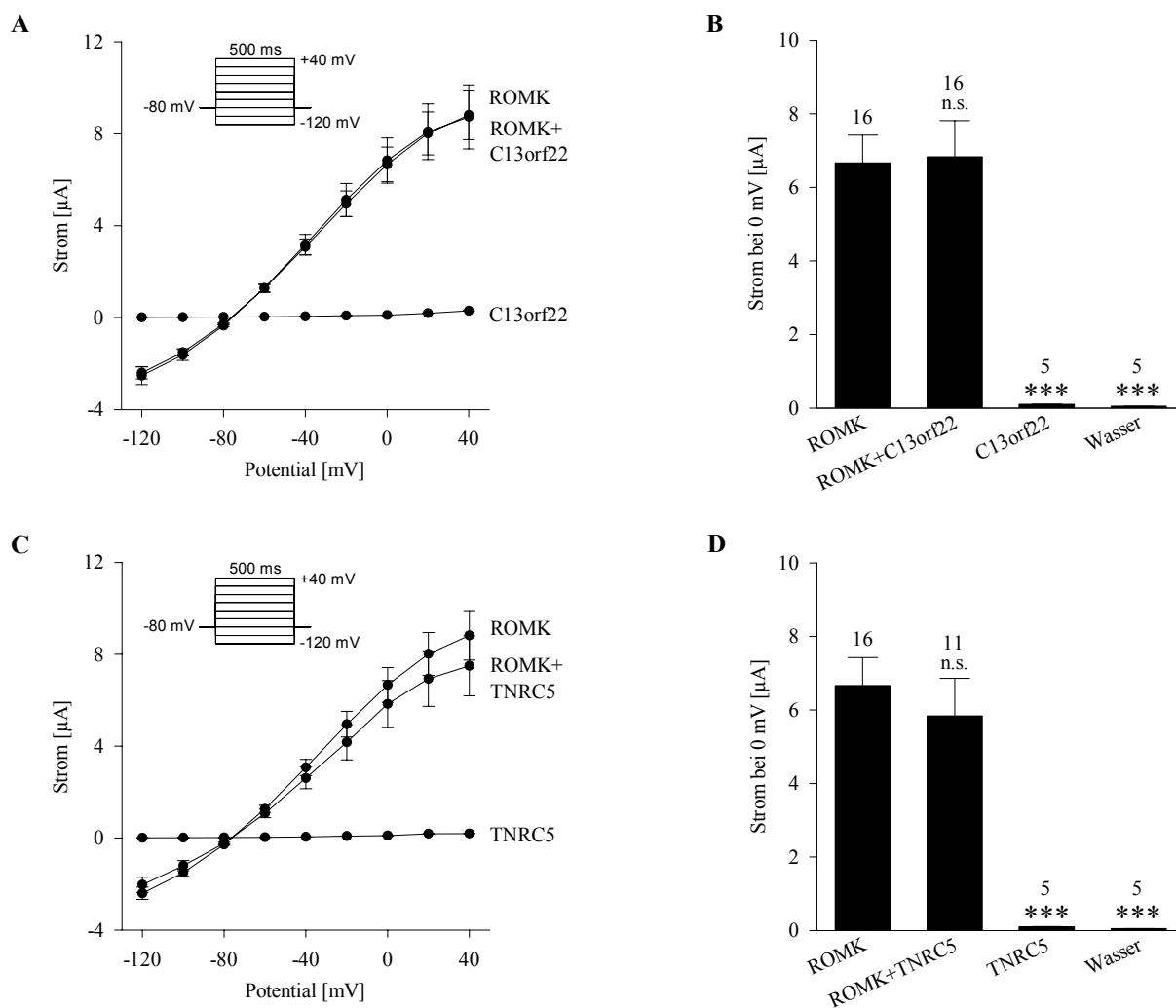


Abbildung 33: Koexpression von ROMK mit C13orf22 oder TNRC5. Repräsentative Messungen der Kaliumströme 48 h nach Injektion von 0,05 ng hROMK2- und/oder 5,0 ng C13orf22 (A, B) bzw. TNRC5- (C, D) cRNS. A und C, Strom-Spannungs-Kurven (Mittelwerte  $\pm$  SEM) sowie verwendetes Spannungsprotokoll. B und D, mittlere Stromamplituden aus A und C bei einem Potential von 0 mV. Die Sternchen zeigen die Signifikanz im Vergleich zu Oozyten, die nur ROMK exprimierten. Die Anzahl (*n*) der gemessenen Oozyten ist über den Säulen angegeben (n.s. = nicht signifikant).



## 4 Diskussion

Die allgemein verbreitete Betrachtungsweise vieler zellulärer Prozesse sind Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen, die miteinander interagieren. Zwar ist schon lange bekannt, daß beispielsweise Ribosomen, die die Poteinbiosynthese katalysieren, supramolekulare Komplexe aus mehreren Ribonukleinsäuren und vielen Proteinen bilden, doch haben erst die Arbeiten der letzten Jahre gezeigt, daß die meisten Proteine nicht alleine arbeiten, sondern sich dauerhaft oder vorübergehend zu Multiproteinkomplexen vernetzen. Es wurde deutlich, daß viele Proteine Bestandteil von mehreren Komplexen sind oder unter besonderen physiologischen Bedingungen andere Funktionen in der Zelle übernehmen (Abbott, 2002).

Auch Kaliumkanäle bilden solche Multiproteinkomplexe. Dabei können die tetrameren Kanalproteine dauerhaft oder zeitweilig mit unterschiedlichen, membranständigen oder zytosolischen  $\beta$ -Untereinheiten sowie mit einer Vielzahl von anderen strukturellen und funktionellen Proteinen und Molekülen interagieren. Diese Interaktionspartner können durch ihre Bindung die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der Kanalproteine verändern und deren Aktivität über eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen modulieren. Andere wiederum beeinflussen die Expression des Kanalkomplexes in der Plasmamembran, indem sie entweder den Transport des Komplexes entlang des sekretorischen Weges von seiner Biogenese am Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis zur Zelloberfläche steuern, oder dessen Endozytose und letztlich seinen Abbau fördern.

Auch der ROMK-Kaliumkanal unterliegt einer umfangreichen Regulation durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren (Hebert *et al.*, 2005; Wang, 2006). Nicht alle Eigenschaften des nativen ROMK-Kanals können in heterologen Expressionssystemen reproduziert werden. Teilweise bestehen auffällige Unterschiede zwischen dem heterolog exprimierten und dem nativen Kanal (McNicholas *et al.*, 1996a; Ali *et al.*, 1998). Zudem sind die molekularen Mechanismen der Kanalregulation sowie die daran beteiligten regulatorischen Interaktionspartner vielfach noch nicht bekannt. So sind beispielsweise die Proteine, die an der cAMP-induzierten Aktivierung von ROMK durch PKA beteiligt sind, nicht eindeutig charakterisiert (Ali *et al.*, 1998). Weitere Unterschiede bestehen in der Pharmakologie der Sulfonylharnstoffe und der Sensitivität gegenüber intrazellulärem ATP (Wang *et al.*, 1995; Konstas *et al.*, 2002; McNicholas *et al.*, 1996a).

Funktionelle Analysen haben ergeben, daß viele regulatorische Prozesse am Carboxyterminus des Kanalproteins angreifen, und es konnten auch bereits erste Interaktionspartner des Kanals identifiziert werden.

Der C-Terminus stellt mehr als die Hälfte des gesamten Proteins dar und enthält mehrere Phosphorylierungsstellen für die Serin/Threonin-Proteinkinasen PKA und PKC sowie für die Proteintyrosinkinase. Diese Kinasen modulieren sowohl direkt die Aktivität des Kanalproteins als auch seine Expression an der Plasmamembran. Im C-Terminus befinden sich auch Aminosäuren, die

für das pH-abhängige *Gating* des Kanals von Bedeutung sind (Hebert *et al.*, 2005). Der extreme C-Terminus enthält ein Erkennungsmotiv für die Bindung von PDZ-Proteinen und die PDZ-Proteine NHERF-1 und NHERF-2 erhöhen in heterologen Zellsystemen die Oberflächenexpression des ROMK-Kanals (Shenolikar & Weinman, 2001; Yoo *et al.*, 2004). Wie andere einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle wird auch der ROMK-Kanal durch das Membranphospholipid PIP<sub>2</sub> aktiviert, das an positiv geladene Aminosäuren im C-Terminus bindet (Huang *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2002). Der C-Terminus enthält außerdem Signalsequenzen für die WNK4-vermittelte Endozytose des Proteins von der Zellmembran (Zeng *et al.*, 2002) sowie für seinen Export aus dem ER heraus (Ma *et al.*, 2001) und vermutlich auch für die Retention des Kanals im ER (Yoo *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2005). Eine Reihe von Mutationen, die den Funktionsverlust des ROMK-Kanals bewirken und dem Bartter-Syndrom vom Typ II zugrunde liegen (Bartter *et al.*, 1962; Karolyi *et al.*, 1997), betreffen C-terminale Aminosäuren und die Mehrzahl von ihnen verhindert den Transport des Kanalproteins an die Zelloberfläche (Peters *et al.*, 2003).

Die herausragende Bedeutung des C-Terminus für die Funktion des ROMK-Kanals machte diesen Abschnitt des Proteins besonders interessant für die geplante Suche nach neuen Interaktionspartnern. Zu diesem Zweck und für die nachfolgende Charakterisierung von gefundenen Protein-Protein-Interaktionen stehen zwei grundsätzlich verschiedene methodische Ansätze zur Verfügung. Das erste sind proteinbiochemische *in vitro* Verfahren wie die Affinitätschromatographie oder die Koimmunpräzipitation und anschließende Identifizierung der Bindungsproteine durch Proteinsequenzierung oder mit Hilfe der Massenspektroskopie. Dann gibt es das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Fieldes & Song, 1989), ein molekulargenetisches *in vivo* Verfahren, mit dem relativ einfach ganze cDNS-Bibliotheken nach möglichen interagierenden Proteinen durchmustert werden können. Viele bekannte Kanaluntereinheiten und akzessorische Proteine wurden bereits mit dieser Methode identifiziert. Hierzu gehören beispielsweise das Kalziumbindungsprotein Calmodulin, das die Kalzium-abhängige Regulation der SK-Kaliumkanäle vermittelt (Xia *et al.*, 1998) und das KChAP-Protein, welches die Expression verschiedener spannungsabhängiger Kv-Kanäle beeinflusst (Wible *et al.*, 1998). Vorteile des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems gegenüber den *in vitro* Verfahren sind, daß die Analyse unter Bedingungen in einer Zelle stattfindet, die auch den Nachweis schwacher Interaktionen ermöglichen, und daß die gefundenen Interaktionsproteine sehr einfach durch Sequenzierung der „gefischten“ cDNS-Klone identifiziert werden können.

Für die Suche neuer Interaktionspartner von ROMK verwendeten wir ein modifiziertes Hefe-Zwei-Hybrid-System. Hierfür wurde das C-terminale ROMK-Köderprotein am aminoterminalen Ende mit einer Leucizipperdomäne fusioniert (Harbury *et al.*, 1993; Zerangue *et al.*, 2001). Dieses Proteinfsegment besitzt eine *Coiled-coil*-Struktur, die untereinander Tetramere ausbildet und somit in der Hefezelle die native Struktur des ROMK-Kanalproteins nachstellt. Die Hoffnung war, daß damit auch Proteine identifiziert werden können, deren Bindung an den Kanalkomplex das Vorliegen dieser tetrameren Struktur voraussetzt.

Viele Ionenkanäle besitzen ebenfalls *Coiled-Coil*-Domänen. Solche Strukturen befinden sich beispielsweise in den C-terminalen Regionen der spannungsgesteuerten Eag- und KCNQ-Kaliumkanäle sowie der kalziumaktivierten IK- und SK-Kanäle. Auch hier sind sie für die Tetramerisierung der Kanalproteine wichtig. Sie beeinflussen nicht nur die Stabilität der Interaktion von vier identischen Untereinheiten, sondern auch die Bildung von heteromeren Kanalproteinkomplexen, indem sie die Selektivität der Wechselwirkung mit anderen Untereinheiten beeinflussen (Jenke *et al.*, 2003; Kanki *et al.*, 2004; Schwake *et al.*, 2003; Syme *et al.*, 2003).

In Vorversuchen konnten wir mit dem modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-System die zuvor mit dem klassischen System gezeigte und durch funktionelle Studien bestätigte selektive Interaktion der Kanalproteine HCN2 und HCN4 mit der regulatorischen Untereinheit KCNE2 (Decher *et al.*, 2003) reproduzieren. Die Leucinzipper-Struktur führte dabei nicht zu einer „falschpositiven“ Interaktion mit verwandten KCNE-Untereinheiten. Einige in dieser Arbeit neu identifizierte ROMK-Interaktionsproteine enthielten ebenfalls eine Coiled-coil-Domäne. In geeigneten Kontroll-experimenten konnte aber ausgeschlossen werden, daß die Bindung durch die Coiled-coil-Domäne erfolgte.

Nach mehrmaligem Durchmustern zweier cDNS-Bibliotheken aus menschlicher Niere konnten 25 Proteine identifiziert werden, die anhand ihrer bekannten oder vermuteten Funktion in acht funktionelle Gruppen unterteilt wurden. Die mit sechs Vertretern größte Gruppe war die der Transkriptionsfaktoren. Das Auffinden von nukleären Transkriptionsfaktoren mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System kann ein Artefakt der Methode sein, die auf der transkriptionellen Aktivierung im Zellkern der Hefezellen beruht. Allerdings übt z.B. die Kanaluntereinheit KChIP (Carrion *et al.*, 1999; An *et al.*, 2000) gleichzeitig die Funktion als Transkriptionsfaktor aus (Chung *et al.*, 1997; Wible *et al.*, 1998). Die mit fünf Vertretern zweitgrößte Gruppe enthielt Proteine mit bisher unbekannter Funktion. Die restlichen Proteine konnten in die Gruppen *Trafficking*, Signaltransduktion, Zellproliferation, Metabolismus, Translation, Proteasom und Zelladhäsion eingeordnet werden. Unter den möglichen Interaktionspartnern von ROMK war somit keine funktionelle Gruppe besonders prominent.

Aufgrund von Literaturangaben haben wir sieben der möglichen Interaktionspartner von ROMK für weitergehende funktionelle Untersuchungen ausgewählt, darunter Golgin-160, GRB7 und PP2A B56 $\beta$ . Nachfolgend sollen die erzielten Ergebnisse sowie die mögliche physiologische Bedeutung der hier erstmalig beschriebenen Interaktionen diskutiert werden.

#### 4.1 Golgin-160

Golgin-160 (Fritzler *et al.*, 1993) gehört zur Proteinfamilie der Golgine, die an der strukturellen Organisation des Golgi-Apparates sowie an der Anheftung von Vesikeln an die Golgimembran beteiligt sind (Barr & Short, 2003). Es besteht aus 1498 Aminosäuren (AS) und ist an der zytoplasmatischen Seite der *cis*-Golgi-Matrix lokalisiert (Misumi *et al.*, 1997; Kim, 2003). Wie für Golgine charakteristisch, besitzt Golgin-160 eine ausgedehnte Coiled-coil Struktur (AS 394-1459), die eine kurze Unterbrechung aufweist (AS 597-645). Das isolierte cDNS-Beutekonstrukt kodierte für einen 236 Aminosäuren großen Abschnitt (AS 614-849) des Golgin-160-Proteins. Dadurch war die Interaktionsfläche größtenteils auf diese Unterbrechung und den angrenzenden Teil der Coiled-coil-Domäne beschränkt.

Eine Reihe von Hinweisen ließ vermuten, daß Golgin-160 am Transport von ROMK vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) an die Zelloberfläche beteiligt sein könnte. So war für das homologe Protein aus Hefe, GRP1, bereits eine Beteiligung am Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat nachgewiesen worden (Kim *et al.*, 1999). Das Golgin-160-Protein bindet zudem an der *cis*-Seite des Golgi-Apparates an das Golgi-Protein GCP16, welches durch seinen Lipidanteil in der Golgimembran verankert ist. Durch die Bindung an GCP16 wird auch Golgin-160 an die Golgimembran gebunden. Die Überexpression von GCP16 beeinflusste in Versuchen den Transport von Virusproteinen an die Zelloberfläche (Ohta *et al.*, 2003). Schließlich wurde für ein weiteres Golgi-Protein, GM130, beschrieben, daß es an der Regulation der Oberflächenexpression des HERG-Kaliumkanals beteiligt ist (Roti Roti *et al.*, 2002).

Die mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifizierte, physikalische Interaktion zwischen ROMK und Golgin-160 wurde durch Koimmunpräzipitation aus Lysaten transfizierter Säugerzellen bestätigt. Dazu verwendeten wir den löslichen C-Terminus von ROMK, da sich das vollständige Kanalprotein trotz Verwendung geeigneter Detergenzien nicht aus den Extrakten von Säugerzellen oder *Xenopus* Oozyten herauslösen ließ. Dies scheint eine besondere Eigenschaft des ROMK-Kanalproteins zu sein, da auch andere Autoren für ähnliche Studien nur den C-Terminus von ROMK verwendeten. Ein Beispiel hierfür ist die Koimmunpräzipitation von ROMK mit der Serin/Threonin-Kinase WNK4, die die Häufigkeit des Kanalproteins an der Zellmembran reguliert (Kahle *et al.*, 2003).

Die physikalische Interaktion zwischen Golgin-160 und ROMK scheint aufgrund unserer immunzytochemischen Untersuchungen in Säugerzellen auf den Golgi-Apparat beschränkt zu sein. Die subzelluläre Lokalisation von Golgin-160, das ausschließlich im Golgi-Apparat vorkommt, war nach der Koexpression mit dem ROMK-Protein nicht verändert. Wir fanden keine Hinweise darauf, daß das Golgin-160-Protein zusammen mit dem Kanalprotein an die Zelloberfläche gelangt. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die beiden Proteine nur zeitweilig während der Passage des Kanalproteins im frühen sekretorischen Weg zwischen ER und Golgi-Apparat miteinander interagieren.

Für die Untersuchung der funktionellen Interaktion von ROMK und Golgin-160 wählten wir das Oozytenexpressionssystem. Das ROMK-Protein wird in *Xenopus laevis* Oozyten effizient an die Zelloberfläche transportiert, während seine Oberflächenexpression in kultivierten Säugerzellen aus bisher unbekanntem Gründen sehr gering ist. Dort akkumuliert es vorwiegend im ER und wird anschließend degradiert (Brejon M *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2003). Die Oozyten boten außerdem die Möglichkeit, die Stärke der Kanalexpression durch unterschiedliche Mengen an injizierter cRNS sowie durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten zu variieren. Dadurch war es möglich, die funktionelle Interaktion unabhängig von der Stromgröße zu analysieren und dadurch bedingte unspezifische Einflüsse auszuschließen.

Die Koexpression von Golgin-160 erhöhte die Stromamplitude von ROMK reproduzierbar durchschnittlich um das zweifache, in einigen Experimenten sogar um das dreifache. Parallele Bestimmungen des an der Zelloberfläche vorkommenden ROMK-Proteins zeigten auch eine Zunahme des Kanalproteins im selben Ausmaß. Folglich war die gemessene Stromzunahme auf eine Erhöhung der Kanalproteindichte in der Plasmamembran und nicht durch eine Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit oder der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zurückzuführen. Eine entsprechende Änderung der biophysikalischen Eigenschaften des ROMK-Kanalproteins wäre sehr wahrscheinlich nur durch eine ständig mit ihm eng assoziierte Kanaluntereinheit möglich, was aber bei Golgin-160 nicht der Fall ist. Aus demselben Grund war auch die Sensitivität der stimulierten Ströme gegenüber Barium und Chinidin im Vergleich zu den Ausgangsströmen nicht verändert. Dadurch war auch nachgewiesen, daß Golgin-160 spezifisch nur die ROMK-Kanäle, nicht aber endogene Kaliumkanäle der Oozyten stimuliert. Eine Beeinflussung der Resultate durch eine allgemeine Steigerung der Proteinbiosynthese durch das Golgi-Protein war ebenfalls sehr unwahrscheinlich, da die Koexpression eines vergleichbar großen und nicht funktionalen MaxiK-Kaliumkanalproteins keinen Einfluß auf den ROMK-Strom hatte. Dagegen wurden die gemessenen Stromamplituden durch die Menge an injizierter Kanal-cRNS sowie von der Inkubationszeit beeinflusst. Nach Koinjektion großer Mengen Kanal-cRNS war keine weitere Zunahme des ROMK-Stroms sichtbar. Dies kann einfach dadurch erklärt werden, daß das kleine Kanalprotein viel schneller synthetisiert und auch sehr effizient in die Plasmamembran eingebaut wird, wodurch es schnell zu einer Sättigung der Stromamplitude kommt. Entsprechend dieser Annahme wurde nach sehr kurzer Inkubationszeit nur eine schwächere Wirkung des Golgin-160 auf den ROMK Strom beobachtet. Für die Translation des viel größeren Golgi-Proteins wird entsprechend mehr Zeit benötigt, weshalb die Stimulation des Stroms auch mit zunehmender Inkubationsdauer noch zunimmt.

Eine ähnlich starke Zunahme der Oberflächenexpression wie in Oozyten konnte in Säugerzellen nicht beobachtet werden. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen ist es generell schwierig, Fluoreszenzsignale insbesondere an der Zelloberfläche zu quantifizieren. Zum anderen verbleibt das ROMK-Protein in transfizierten Säugerzellen bekanntermaßen größtenteils in intrazellulären Kompartimenten und ist nur zu einem sehr geringen Anteil an der Zelloberfläche

lokalisiert (Yoo *et al.*, 2003, 2004). Bei einer Verdopplung der Kanaldichte in der Plasmamembran dürfte deshalb das Zelloberflächensignal immer noch unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegen. Für eine Quantifizierung des Signals fehlt jedoch eine entsprechende biochemische Nachweismethode des Oberflächenproteins in transfizierten Säugerzellen.

Zusammengefaßt zeigen unsere Untersuchungen, daß Golgin-160 am Golgi-Apparat spezifisch mit dem C-Terminus von ROMK interagiert und sehr wahrscheinlich dadurch den Weitertransport des Kanals an die Zelloberfläche beeinflusst. Damit funktioniert Golgin-160 nicht wie eine klassische  $\beta$ -Untereinheit und beeinflusst außer der Kanaldichte an der Zellmembran weder die biophysikalischen noch die pharmakologischen Eigenschaften des membranständigen ROMK-Kanals.

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von ROMK und Kir2.1 war die beobachtete Stimulation dieses Kanals durch Golgin-160 naheliegend. Eine direkte Bindung von Golgin-160 an den C-Terminus von Kir2.1 ist in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen worden. Dennoch ist dies aufgrund der engen Verwandtschaft beider Kanalproteine recht wahrscheinlich. Die in Oozyten erhaltenen Resultate aus der Koexpression beider Kir-Kanäle mit Golgin-160 waren praktisch identisch. Im Western-Blot wurde zudem gezeigt, daß Golgin-160 die Gesamtmenge des Kir2.1-Kanalproteins nicht verändert, sondern ausschließlich die Menge des Kanalproteins an der Plasmamembran erhöht. Obwohl ebenfalls nicht gezeigt, kann man davon ausgehen, daß dies auch bei ROMK der Fall ist.

Die Beobachtung, daß die Überexpression von Golgin-160 auch die Ströme der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle Kv1.5 und Kv4.3 stimuliert war jedoch überraschend, da die einwärtsrektifizierenden und die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle generell und insbesondere im Bereich ihrer zytosolischen Domänen nur eine sehr schwache Übereinstimmung ihrer Proteinsequenzen aufweisen. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß der Mechanismus der Stimulation in beiden Fällen identisch ist. Es ist denkbar, daß ROMK und Kir2.1 durch eine direkte Interaktion und die Kv-Kanäle durch eine indirekte Wechselwirkung mit Golgin-160 in ihrem Zelloberflächentransport beeinflusst werden. Ähnliche Beispiele sind in der Literatur beschrieben. Das mit ROMK und Kir2.1 verwandte Kir2.2-Kanalprotein bindet mit seinem C-terminalen Bindemotiv an das PDZ-Protein SAP97 (*Synapse-Associated Protein 97*), wodurch die Amplitude des Kaliumstroms erhöht wird. (Leonoudakis *et al.*, 2001). SAP97 stimuliert auch den Strom des koexprimierten Kv1.5-Kanals. Das Kv1.5-Protein besitzt zwar ebenfalls ein PDZ-Bindemotiv, aber dessen Deletion hat keinen Einfluß auf die SAP97-vermittelte Stimulation (Eldstrom *et al.*, 2003). Zudem konnte weder *in vivo* noch *in vitro* eine direkte Interaktion zwischen Kv1.5 und SAP97 nachgewiesen werden. Dieses Beispiel zeigt sehr anschaulich, daß regulatorische Proteine gleiche Wirkungen über unterschiedliche Mechanismen erzielen können.

Für eine spezifische Rolle von Golgin-160 beim Transport der untersuchten Ionenkanalproteine spricht auch der Befund, daß die Zelloberflächenexpression des M2-Rezeptors, der

zur Proteinfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, durch das Golgi-Protein nicht verändert wurde.

Die beobachtete Stimulation von ROMK und anderen Kaliumkanälen durch Golgin-160 war ein neuartiger Befund und steht auch im Gegensatz zu ähnlichen Beobachtungen mit anderen Golginen. So hatte beispielsweise die Überexpression der Golgi-Proteine GCP60 (Sohda *et al.*, 2001), BAP31 (Lambert *et al.*, 2001) und GM130 (Roti Roti *et al.*, 2002) immer eine hemmende Wirkung auf den Transport von koexprimierten Proteinen an die Plasmamembran zur Folge.

GM130 (Golgin-95) ist das am besten charakterisierte Golgin. Es besitzt keine Sequenzähnlichkeit zu Golgin-160, wurde aber wie Golgin-160 ursprünglich auch als Autoantigen (Fritzler *et al.*, 1993) und Golgi-Matrixprotein beschrieben (Nakamura *et al.*, 1995). GM130 ist wie Golgin-160 auf der zytoplasmatischen Seite der *cis*-Golgi-Membran lokalisiert. Dort soll es an der Bindung von COPII-Vesikeln beteiligt sein (Barr *et al.*, 1997, 1998), die den Transport von neu synthetisierten Proteinen vom ER zum Golgi vermitteln und mit Hilfe eines Proteinkomplexes an die *cis*-Golgi-Membran andockt werden. Man stellt sich vor, daß GM130 hierbei mit der GTPase Rab1 und dem Golgi-Protein p115 interagiert, nachdem diese wiederum an die COPII-Vesikel gebunden haben. GM130 bindet daraufhin an das in der Golgi-Membran verankerte GRASP65 und bringt dabei die COPII-Vesikel in räumliche Nähe zur *cis*-Golgi-Membran. Mit Hilfe des SNARE-Membran-fusionskomplexes verschmelzen diese dann schließlich miteinander (Nakamura *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 2001; Moyer *et al.*, 2001; Short & Barr, 2003; Gillingham & Munro, 2003; Duden, 2003; Murshid & Presley, 2004).

GM130 wurde beim Durchmustern einer humanen Herz-cDNA-Bibliothek mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems auch als Interaktionspartner für den C-Terminus des HERG-Kaliumkanals identifiziert. Die Überexpression von GM130 in *Xenopus* Oozyten erniedrigte die Stromamplitude des koexprimierten HERG-Kanals (Roti Roti *et al.*, 2002), was zu der Schlußfolgerung führte, daß GM130 an der Regulation des HERG-Kanals beteiligt ist. Diese Ergebnisse waren überraschend, da bis zu diesem Zeitpunkt angenommen wurde, daß das GM130-Protein eher eine generelle Rolle beim Vesikeltransport zwischen ER und Golgi spielt. Die Bindung von GM130 an das HERG-Protein war ein erster Hinweis darauf, daß die am Membrantransport beteiligten Proteine hierbei auch spezifisch mit den in den Vesikeln transportierten Proteinen interagieren. Ob diese Interaktion dann einfach deren Weitertransport fördert, oder ob sie auch eine Form der Qualitätskontrolle widerspiegelt, kann aufgrund dieser Versuche nicht beurteilt werden.

Die hemmende Wirkung von GM130 auf den HERG-Strom konnte in eigenen Experimenten bestätigt werden, während aber kein Effekt von Golgin-160 auf HERG beobachtet wurde. Im Gegensatz zu seinem hemmenden Effekt auf HERG erhöhte das koexprimierte GM130 aber den ROMK-Strom. Die unterschiedlichen bzw. gegensätzlichen Wirkungen beider Golgi-Proteine auf ROMK und HERG zeigten, daß das überexprimierte Golgin-160 nicht generell eine stimulatorische

Wirkung ausübt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß Golgin-160 und GM130 unterschiedliche Rollen beim Transport bestimmter Membranproteine an die Zelloberfläche spielen. Möglicherweise sind Golgin-160 und GM130 auch nicht nur mit Proteinen für das Andocken und die Fusion von Vesikeln an die Golgi-Membran assoziiert, sondern zusätzlich mit weiteren Proteinen, die die Interaktion zwischen den Bestandteilen von Vesikel-Bindekomplexen in Abhängigkeit von Signalwegen regulieren.

Die funktionelle Analyse von ROMK-Mutationen, die zum Bartter-Syndrom führen (Bartter *et al.*, 1962; Karolyi *et al.*, 1997), hat erste Hinweise auf die zugrundeliegenden krankheitsverursachenden Mechanismen ergeben. Demzufolge verhindert nur eine sehr geringe Anzahl von Mutationen die Bildung von Transkripten. Jeweils etwa nur ein Fünftel der Mutationen führt zu einer unvollständigen Translation des Proteins oder bewirkt eine gestörte Regulation der Kanalaktivität. Nur jede zehnte der bekannten Mutanten erreicht die Zelloberfläche, ist aber dort nicht mehr funktionell aktiv. Die Hälfte der untersuchten Mutationen zeigt eine Störung beim Transport des Kanalproteins an die Zelloberfläche, wodurch es zu einer Anhäufung der Mutantenproteine im ER oder Golgi-Apparat kommt. Diese fehlerhafte subzelluläre Lokalisierung kann in Oozyten durch eine sehr starke Überexpression der Mutantenproteine teilweise wieder ausgeglichen werden (Peters *et al.*, 2003).

Roti Roti und Mitarbeiter (2002) zeigten außerdem, daß C-terminale LQT2 (*Long QT Syndrome Type 2*)-Mutanten die Interaktion zwischen dem HERG-Kanalprotein und GM130 stören und leiteten daraus eine mögliche Bedeutung dieser gestörten Interaktion für das Entstehen des LQT2-Syndroms ab. Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir untersucht, ob C-terminale ROMK-Mutationen ebenfalls eine Störung der Interaktion zwischen ROMK und Golgin-160 verursachen und somit den Defekt beim Transport des Kanals an die Zelloberfläche bewirken.

Die untersuchten C-terminal trunkierten Kanalproteine und Punktmutanten waren aber noch zur Bindung an Golgin-160 fähig und machen damit eine ursächliche Beteiligung dieser Interaktion bei der Entstehung des Bartter-Syndroms unwahrscheinlich. Die Tatsache, daß zwei der untersuchten Punktmutanten nach Verwendung der zehnfachen Menge an cRNS außerdem noch durch das koexprimierte Golgin-160 stimuliert wurden, verstärkte diese Annahme. Es ist davon auszugehen, daß die untersuchten ROMK-Mutanten bereits im ER akkumulieren und somit unter physiologischen Bedingungen nicht mit Golgin-160 in Kontakt kommen. Die Analyse der beiden untersuchten C-terminalen Trunkationen von ROMK zeigte außerdem, daß der extreme C-Terminus, der z.B. an der Regulation der ROMK-Zelloberflächenexpression durch die WNK4-abhängige Endozytose und an der Interaktion mit NHERF-1/2 beteiligt ist, für die Interaktion mit Golgin-160 nicht von Bedeutung ist. Diese Untersuchungen schließen aber nicht völlig aus, daß andere krankheitsverursachende ROMK-Mutationen die Interaktion mit Golgin-160 stören könnten. Für die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen kann dies aber weitgehend ausgeschlossen werden.



Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Erkennung des ROMK-Proteins durch Golgin-160 dessen Transport an die Plasmamembran beeinflussen kann. Leider hat die Analyse verschiedener Mutationen im C-Terminus des Kanalproteins keinen weiteren Hinweis für die physiologische Bedeutung dieser Interaktion und deren mögliche Beteiligung an der Pathophysiologie des ROMK-Kanals ergeben. Auch der genaue Mechanismus, wie die Interaktion beider Proteine das weitere *Trafficking* des Kanalproteins an die Zelloberfläche beeinflusst, konnte durch diese Untersuchungen nicht aufgeklärt werden.

Ein erster Hinweis auf eine mögliche Modulation dieser Interaktion ergab sich jedoch durch eine Sequenzanalyse des Golgi-Proteins, die das Vorkommen von zwei potentiellen Phosphorylierungsstellen der Serum- und Glucocortikoid-regulierte Proteinkinase SGK1 anzeigte. Dieser Proteinkinase wird eine Rolle bei der Regulation des ROMK-Kanals zugeschrieben, wohingegen der zugrundeliegende Mechanismus in der Literatur kontrovers diskutiert wird. So ist einerseits gezeigt worden, daß SGK1 alleine die Aktivität von ROMK nicht verändert, sondern erst nach Koexpression von NHERF2 dessen Oberflächenexpression und Stromamplitude erhöht. Das NHERF2-Protein hatte alleine ebenfalls keinen Einfluß auf die ROMK-Aktivität (Yun *et al.*, 2002). Andererseits wurde beschrieben, daß das Serin an Position 44 (S44) im N-Terminus von ROMK, welches auch durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wird (McNicholas *et al.*, 1994), ein Substrat von SGK1 ist. Die Stromamplitude und die Oberflächenexpression der ROMK-Mutante S44A waren stark reduziert, während beide Werte für die S44D-Mutante, die eine Phosphorylierung nachahmt, im Vergleich zum Wildtyp erhöht waren. Da wir die gleiche stimulatorische Wirkung auch nach der Koexpression von SGK1 mit dem ROMK-Wildtyp beobachteten, wurde angenommen, daß die Phosphorylierung von S44 durch SGK1 eine Rolle beim Export des ROMK-Kanals aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) spielt (Yoo *et al.*, 2003). Die Aminosäure S44 liegt zudem in unmittelbarer Nähe zu dem Sequenzmotiv RXR, das bei anderen Kir-Kanälen als ER-Retentionssignal wirkt (Zerangue *et al.*, 1999). In einer weiteren Arbeit wurde die nach SGK1-vermittelter Phosphorylierung von S44 erfolgte Zunahme des ROMK-Stroms jedoch mit einer Verschiebung der pH-Sensitivität des Kanals und nicht mit einer Zunahme der Oberflächenexpression korreliert (Palmada *et al.*, 2003). Kürzlich wurde wiederum beschrieben, daß die Phosphorylierung von S44 die Oberflächenexpression von ROMK durch die Hemmung eines C-terminalen ER-Retentionssignals erhöht, das sich in der dreidimensionalen Struktur des Kanals in unmittelbarer Nähe des N-terminalen Serins befindet (O'Connell *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005).

Es könnte demnach mindestens zwei voneinander unabhängige Regulationsmechanismen geben, die durch SGK1-Phosphorylierung von S44 vermittelt werden. Zum einen eine direkte Modulation der Kanaleigenschaften (pH-Sensitivität) und zum anderen die Erhöhung seiner Oberflächenexpression, die durch eine Steigerung des Transports zur Plasmamembran als Folge einer verminderten Retention im ER bewerkstelligt wird.

Um eine mögliche Beteiligung von SGK1 an der Interaktion zwischen ROMK und Golgin-160 nachzuweisen, haben wir Koexpressionsstudien durchgeführt. In diesen wurden neben der Wildtyp-Kinase auch eine konstitutiv-aktive (S422D) und eine dominant-negative Mutante (T256A/S422A) eingesetzt. In Anwesenheit von Golgin-160 konnte die in der Literatur beschriebene SGK1-abhängige Steigerung des ROMK-Stroms nicht beobachtet werden. Die Wildtyp- und die konstitutiv-aktive Kinase hemmten nach Koexpression die Stimulation von ROMK durch Golgin-160. Die dominant-negative SGK1-Mutante zeigte ebenfalls eine hemmende Wirkung. Im Vergleich zur Wildtyp- und konstitutiv-aktiven Kinase hätte man eher keine oder vielleicht eine steigernde Wirkung erwarten können. Die dominant-negative SGK1-Mutante ist in der Literatur allerdings funktionell nicht näher charakterisiert worden, so daß eine gewisse Restaktivität dieser Mutante durchaus möglich wäre. Vermutlich hätte die Verwendung der Mutante SGK1(K127N), die eine defekte ATP-Bindestelle aufweist, mehr Aufschluß gebracht. Diese stand jedoch nicht zur Verfügung. Unsere präliminären Ergebnisse lassen zwar die Vermutung zu, daß die SGK1-Kinase eine Rolle bei der Wechselwirkung zwischen dem ROMK-Kanal und Golgin-160 spielen könnte, jedoch lieferten die mit den beiden Mutantenproteinen erzielten Resultate kein klares Bild. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen. Dabei könnte die Verwendung von Golgin-160-Mutanten, bei denen die beiden potentiellen SGK1-Phosphorylierungsstellen einzeln oder gleichzeitig mutiert sind und die Verwendung der ATP-bindungsdefekten SGK1-Kinase hilfreich sein.

Kürzlich identifizierten Hicks und Machamer (2005) das PIST-Protein als neuen Interaktionspartner von Golgin-160. PIST (*PDZ Domain Containing Protein Interacting Specifically with TC10*) ist auch als GOPC (*Golgi-associated PDZ and Coiled-coil Motif-containing Protein*) oder CAL (*CFTR-associated Ligand*) bekannt und bindet in der N-terminalen Kopfdomäne von Golgin-160 an ein Sequenzmotiv, das aus vier Leucin-Resten besteht (L-X<sub>6</sub>-L-X<sub>6</sub>-L-X<sub>6</sub>-L) und zwischen den Aminosäuren L121 und L142 liegt. Dieser Bereich enthält auch die Bindestelle von GCP16 (S137 - R169) (Ohta *et al.*, 2003), welches wiederum in der Golgimembran verankert ist. PIST kann über seine C-terminale PDZ-Domäne mit verschiedenen Membranproteinen interagieren, wie mit den Chloridkanälen ClC-3 (Gentzsch *et al.*, 2003) und CFTR (Cheng *et al.*, 2004) (Abb. 34).

Die Überexpression von PIST reduzierte die Gesamtproteinmenge der beiden koexprimierten Chloridkanäle (Gentzsch *et al.*, 2003), indem es wahrscheinlich die Degradation der beiden Kanäle fördert (Cheng *et al.*, 2004). Die kleinen Rho GTPase TC10, die an der Fusion von Membranen beteiligt ist (Neudauer *et al.*, 2001), kann mit PIST interagieren, dessen negative Wirkung neutralisieren und sogar die Oberflächenexpression von CFTR in Anwesenheit von PIST erhöhen (Cheng *et al.*, 2005).

Der CFTR-Chloridkanal ist wahrscheinlich an der Regulation von ROMK beteiligt. CFTR erhöht im heterologen Expressionssystem die Sensitivität des ROMK-Kanals für ATP (Ruknudin *et al.*, 1998), was eine charakteristische Eigenschaft des nativen ROMK in den Epithelzellen des

Nephrons ist (Wang & Giebisch, 1991). CFTR (Shenolikar & Weinman, 2001) und ROMK interagieren beide mit den PDZ-Gerüstproteinen NHERF-1 und NHERF-2 (Yoo *et al.*, 2004). Die Interaktion zwischen ROMK und NHERF-1/2 stimuliert nicht nur die Oberflächenexpression des Kaliumkanals, sondern vermittelt auch die Interaktion mit CFTR (Yoo *et al.*, 2004). Es wird angenommen, daß CFTR im Sammelrohr die Vasopressin- und Aldosteron-vermittelte Stimulierung der Natriumreabsorption über den Natriumkanal ENaC moduliert und diese mit der parallel stattfindenden Erhöhung der Kaliumsekretion über die Aktivierung von ROMK verknüpft (Cassola *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 2003; Eaton *et al.*, 2001; Stutts *et al.*, 1995; Konstas *et al.*, 2002).

Dies läßt vermuten, daß ROMK und ENaC in einem Multiproteinkomplex über das CFTR-Protein funktionell miteinander gekoppelt sind. Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebene Interaktion zwischen Golgin-160 und ROMK, sowie die durch andere Gruppen gezeigten Interaktionen zwischen Golgin-160 und PIST (Hicks & Machamer, 2005), zwischen PIST und CFTR (Gentzsch *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004) und zwischen NHERF und ROMK (Yoo *et al.*, 2004) sowie CFTR (Shenolikar & Weinman, 2001) unterstützen diese Hypothese (Abb. 34).

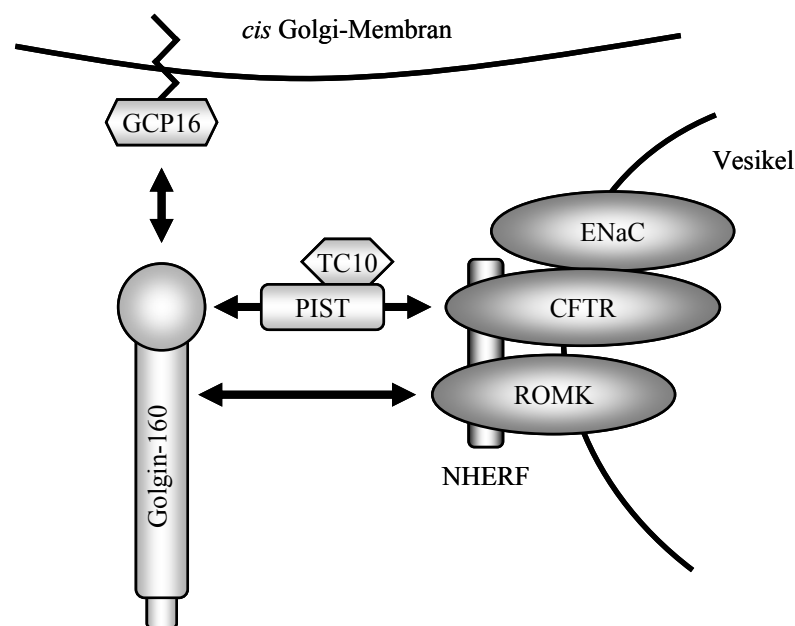


Abbildung 34: Schematische Darstellung eines möglichen Multiproteinkomplexes im frühen sekretorischen Weg bestehend aus CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel), GCP16 (Golgi Cytoplasm Protein, 16 kDa), Golgin-160 (Golgi-Protein, 160 kDa), NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor), PIST (PDZ domain containing protein Interacting Specifically with TC10), ROMK (Renal Outer Medulla K<sup>+</sup> channel) und TC10 (small Rho GTPase).

Unsere Ergebnisse liefern einen Anhaltspunkt dafür, daß Zelloberflächenproteine bereits in einer frühen Phase des sekretorischen Weges mit den am Fusionsproteinkomplex beteiligten Golgi-Proteinen spezifisch interagieren. Das von uns untersuchte Golgin-160 und das von anderen charakterisierte GM130 (Roti Roti *et al.*, 2002) sind demnach nicht nur an der Aufrechterhaltung der

Golgi-Struktur beteiligt und spielen eine generelle Rolle beim Vesikeltransport, sondern erkennen bestimmte Zelloberflächenproteine wahrscheinlich schon vor dem Andocken der Vesikel an die Golgi-Membran. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zur positiven und auch negativen Regulation des sekretorischen Transports. Vielfältige Interaktionen zwischen den Bestandteilen des Fusionsprotein-komplexes und den transportierten Proteinen könnten zudem sicherstellen, daß nur vollständig zusammengesetzte und funktionelle Multiproteinkomplexe weitertransportiert werden und letztlich die Plasmamembran erreichen.

## 4.2 PP2A B56 $\beta$

PP2A B56 $\beta$  ist eine 56 kDa große regulatorische B-Untereinheit der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A. Die verschiedenen B-Untereinheiten des heterotrimeren PP2A-Protein-komplexes bestimmen die subzelluläre Lokalisation sowie die Substratspezifität des Enzymkomplexes (McCright & Virshup, 1995; McCright *et al.*, 1996a). Es gibt zahlreiche experimentelle Hinweise, die für eine mögliche Beteiligung von B56 $\beta$  an der Regulation des Vesikeltransportes zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und der Zelloberfläche sprechen. So ist der PP2A-Enzymkomplex mit der eng verwandten B56 $\gamma$ -Untereinheit an der zytoplasmatischen Seite der *cis*-Golgi-Matrix lokalisiert und hemmt im heterologen Expressionssystem den Transport des viralen Glycoproteins VSV-G an die Zelloberfläche (Ito *et al.*, 2003). Darüber hinaus dephosphoryliert der PP2A-Enzymkomplex mit der B56 $\alpha$ -Untereinheit während der mitotischen Telophase das Golgi-Protein GM130 (Lowe *et al.*, 2000), das als Bestandteil des Vesikel-Bindekomplexes am Membrantransport (Barr *et al.*, 1997, 1998) und an der Regulation des HERG-Kaliumkanals beteiligt ist (Roti Roti *et al.*, 2002). Außerdem ist bekannt, daß die Oberflächenexpression von ROMK durch die Aktivitäten der Serin/Threonin-Proteinkinasen A und C sowie der entsprechenden Proteinphosphatasen reguliert wird (Hebert *et al.*, 2005). Dies ließ uns vermuten, daß die B56 $\beta$ -Untereinheit bei diesen Prozessen eine Rolle spielen könnte.

Die Koexpression von PP2A B56 $\beta$  hatte in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an cRNS eine unterschiedliche Wirkung auf den ROMK-Strom. Während die Injektion geringer Mengen cRNS den ROMK-Strom stimulierte, bewirkte die zehnfache Menge eine starke Hemmung. Die beobachteten, entgegengesetzten Effekte könnten sich dadurch erklären lassen, daß kleinere Mengen an zusätzlicher B56 $\beta$ -Untereinheit die Verfügbarkeit und damit die Aktivität des resultierenden PP2A-Enzymkomplexes am Golgi-Apparat erhöhen, während ein hoher Überschuß dieser Untereinheit zu Interaktionen mit allen möglichen PP2A-Komplexen und somit zu deren Funktionsverlust führt. Entsprechend wurde auch gezeigt, daß die pharmakologische Inhibition aller PP2A-Enzymkomplexe durch Okadasäure den Vesikeltransport durch die Auflösung der Golgi-Struktur zum Erliegen bringt (Ito *et al.*, 2003).

Die in unseren ersten Untersuchungen erhaltenen Erkenntnisse deuten darauf hin, daß der PP2A-Enzymkomplex mit der B56 $\beta$ -Untereinheit eine regulatorische Funktion beim Vesikeltransport

am Golgi-Apparat sowie beim ROMK-Trafficking ausüben könnte. Weitergehende Untersuchungen sind aber notwendig, um den eindeutigen Nachweis dafür zu erbringen, und um die molekularen Mechanismen dieser Regulation aufzuklären. Diese Untersuchungen müßten zunächst die naheliegenden Fragen beantworten, ob die B56 $\beta$ -Untereinheit tatsächlich zusammen mit ROMK am Golgi-Apparat lokalisiert ist und welche anderen Plasmamembranproteine noch mit dieser Untereinheit der Proteinphosphatase wechselwirken.

### 4.3 GRB7

Neben Golgin-160 und PP2A B56 $\beta$  wurde auch das GRB7-Protein als neuer Interaktionspartner von ROMK gefunden. GRB7 (Margolis *et al.*, 1992) ist ein 60 kDa großes Adapterprotein und bildet zusammen mit GRB10 und GRB14 die GRB7-Proteinfamilie (Daly, 1998; Han *et al.* 2001). GRB7 vermittelt u.a. die Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren zu intrazellulären Signalwegen und verfügt über mehrere Proteindomänen, die hierbei für die Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Proteinen und Effektormolekülen notwendig sind (Shen & Guan, 2004). So sind im GRB7-Protein beispielsweise die src-Homologie 2 (SH2)-Domäne für die Wechselwirkung mit der SH3-Domäne von Tyrosinkinase und die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne für die Bindung von Phospholipiden zuständig (Lemmon *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002). Das Membranphospholipid PIP<sub>2</sub> ist ein Aktivator von einwärtsrektifizierenden Kaliumkanälen (Hilgemann & Ball, 1996). GRB7 könnte daher an der Regulation von ROMK und anderen Einwärtsrektifizierern beteiligt sein. Vom verwandten GRB10-Protein war zudem bekannt, daß es an der Regulation des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 beteiligt ist. Mit Hilfe seiner SH2-Domäne bindet es die Src-Kinase und verhindert somit die Tyrosinphosphorylierung des Kanalproteins und als Folge davon die Hemmung der Kv1.3-Ströme (Cook & Fadool, 2002). Aus diesem Grund wurde GRB7 für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Tatsächlich bewirkte die Koexpression von GRB7 mit ROMK und den naheverwandten Kir2.1- und Kir2.4-Kanälen eine Verringerung der Stromamplituden. Dagegen blieben die Ströme von Kir2.2 und Kir2.3 durch GRB7 unbeeinflusst.

Eine ähnliche regulatorische Wechselwirkung von GRB7 mit einer Proteintyrosinkinase der Src-Familie wie im Fall von GRB10 und Kv1.3 (Cook & Fadool, 2002) ist eher unwahrscheinlich. Die hier beschriebenen Effekte wurden ohne die Koexpression einer Src-Kinase beobachtet und wären daher nur durch die Anwesenheit und Wirkung einer endogenen Kinase erklärbar. Zudem ist bisher für die Kir2-Kanäle keine Regulation durch Src-Kinasen bekannt. Eine Wechselwirkung zwischen GRB7 und PIP<sub>2</sub>, das für die Aktivierung der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle notwendig ist (Hilgemann & Ball, 1996), scheint dagegen eher wahrscheinlich, da GRB7 mit Hilfe seiner PH-Domäne Phosphoinositole binden kann (Shen *et al.*, 2002).

Einige Kir-Kanäle werden außer durch PIP<sub>2</sub> (PI(4,5)P<sub>2</sub>) auch durch andere Phosphoinositole reguliert. So werden ROMK, Kir2.2 und Kir2.3 durch PI(3,4,5)P<sub>3</sub> stark stimuliert, Kir2.1 und Kir2.4 dagegen kaum. Durch PI(3,4)P<sub>2</sub> wird keiner der hier untersuchten Kanäle aktiviert (Rohács *et al.*, 2003). Diese Eigenschaften korrelieren jedoch nicht mit der von uns ermittelten Wirkung des koexprimierten GRB7-Proteins auf die Kanalaktivität, weshalb eine Beteiligung der hier genannten Phosphoinositole an der GRB7-vermittelten Hemmung der Kaliumströme ebenfalls unwahrscheinlich ist.

Zwar werden alle Kir-Kanäle durch PIP<sub>2</sub> reguliert, doch sind die Affinität und damit der Einfluß von PIP<sub>2</sub> innerhalb dieser Kanalfamilie unterschiedlich stark ausgeprägt. Wie in Abbildung 35 dargestellt, sind bei Kir-Kanälen 27 basische Aminosäuren (Lysin, Arginin, Histidin) stark konserviert. Bei Kir2.1 sind zehn dieser Aminosäuren für die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> wichtig. Acht dieser Aminosäuren sind im ROMK-Protein konserviert, von denen sieben bei der ROMK-PIP<sub>2</sub>-Interaktion eine Rolle spielen (Lopes *et al.*, 2002). Unterschiedliche basische Aminosäuren an diesen Positionen vermitteln dabei eine hohe bzw. geringe Affinität zu PIP<sub>2</sub> (Rohács *et al.*, 2002).

Das Leucin an Position 221 (bezogen auf ROMK1) ist für die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> von besonderer Bedeutung und bewirkt bei ROMK, Kir2.1 und Kir2.4 eine starke Interaktion mit PIP<sub>2</sub> und eine schwache Regulation durch andere zelluläre Faktoren (Du *et al.*, 2004). Kir-Kanäle mit einem Isoleucin an dieser Position, wie Kir2.2 und Kir2.3, zeigen dagegen nur eine mäßige bis schwache Interaktion mit PIP<sub>2</sub>. Sie werden vorwiegend durch muscarinerge Stimulation des M1-Rezeptors, durch PKC, intrazelluläres Magnesium und den intrazellulären pH-Wert reguliert. In unmittelbarer Nähe zu dieser Position befindet sich eine von zwei konservierten, putativen PKA-Phosphorylierungsstellen (S219), deren Konsensus-Motiv ebenfalls mögliche PIP<sub>2</sub>-Bindestellen enthält. Damit wird die Bedeutung dieser Region für die Regulation der Kanalaktivität verstärkt (Lopes *et al.*, 2002) (Abb. 35).

Die schwächere Interaktion von Kir2.2 und Kir2.3 sowie die stärkere Interaktion von ROMK, Kir2.1 und Kir2.4 mit PIP<sub>2</sub> (Du *et al.*, 2004) korreliert mit der Wirkung von GRB7 auf die Kaliumkanalaktivitäten. So konnte für die beiden zuerst genannten Kanäle kein Effekt durch GRB7 festgestellt werden, bei den zuletzt genannten wurde dagegen eine Reduktion der mittleren Stromamplituden beobachtet. Es ist daher denkbar, daß GRB7 nach Bindung an das Kanalprotein über seine PH-Domäne PIP<sub>2</sub> bindet und so die PIP<sub>2</sub>-abhängige Aktivierung des Kanals erschwert oder verhindert. Dieser Effekt könnte wie bei ROMK, Kir2.1 und Kir2.4 aber nur bei einer hohen Affinität des Kanals zu PIP<sub>2</sub> zum Tragen kommen, wäre aber bei schwachen Interaktionen, zumindest im Oozytenexpressionssystem, nicht sichtbar.

hROMK1	-----MNASSRNVFDTLIRVLTESMFKHLRKWVVTRFFGHSRQRA <sup>R</sup> RLVSK <sup>D</sup> GR <sup>CN</sup>	50
hKir2.1	--MGSVRTNRYISVSSEEDGMKLATMAVANGFGNGKS--KVHT-RQQCRSR <sup>R</sup> RFVKK <sup>D</sup> GH <sup>CN</sup>	55
hKir2.2	-MTAASRANPYSIVSSEEDGLHLVTMSGANGFGNG----KVHT-RRRCRNR <sup>R</sup> RFVKK <sup>D</sup> NG <sup>CN</sup>	54
hKir2.3	-----MHGHS--RNG----QAHVPRRKR <sup>R</sup> NR <sup>R</sup> RFVKK <sup>D</sup> NG <sup>CN</sup>	29
hKir2.4	MGLARALRRLSGALDSGDSRAGDEEEAGPLCRNGWAPAPVQSPVGRRR <sup>R</sup> GR <sup>R</sup> RFVKK <sup>D</sup> GH <sup>CN</sup>	60
Konsensus	.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	IEFGNVEAQSR <sup>R</sup> FIFFVDIWT <sup>T</sup> LDL <sup>R</sup> KWR <sup>R</sup> YKMTIFITAF <sup>L</sup> GSWFFFGLLWYAVAYIHKDLP	110
hKir2.1	VQFINVGE-KGQRYLADIFTT <sup>T</sup> VDI <sup>R</sup> WR <sup>R</sup> MLVIFCLAFVLSWLF <sup>F</sup> GCVF <sup>W</sup> LIALHGDLD	114
hKir2.2	IEFANMDE-KSQRYLADMFTT <sup>T</sup> VDI <sup>R</sup> WR <sup>R</sup> YMLLIFSLAFLASWLL <sup>F</sup> FGIIF <sup>W</sup> VIAVAHGDL	113
hKir2.3	VYFANLSN-KSQRYMADIFTT <sup>T</sup> VDI <sup>R</sup> WR <sup>R</sup> YMLMIFSAAFVLSWLF <sup>F</sup> GLLFWCIAFFHGDL	88
hKir2.4	VRFVNLLGQGAR <sup>R</sup> YLSDLFTT <sup>T</sup> VDI <sup>R</sup> WR <sup>R</sup> WMCLL <sup>F</sup> FSCSFLASWLL <sup>F</sup> GLAFWLIASLHGDLA	119
Konsensus	..*.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	EFHP-----SANHTPCVENINGLTS <sup>A</sup> FLFSLETQVTIGYGFRCVTEQCAT	155
hKir2.1	AS-----KEGKACVSEVNSFTA <sup>A</sup> FLFSIETQTTIGYGFRCVTEDECP	156
hKir2.2	PAE-----GRGRTPCVMQVHGFM <sup>A</sup> FLFSIETQTTIGYGLRCVTEECV	157
hKir2.3	ASPGVPAAGGPAAGGGGAAPV <sup>A</sup> PKPCIMHVNGFLGAF <sup>L</sup> FSVETQTTIGYGFRCVTEECPL	148
hKir2.4	APP-----PPAPCFSHVASFLA <sup>A</sup> FLFALETQTSIGYGVRSITEECPA	161
Konsensus	.....*.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	AIFLLIFQSILGVIINSFMC <sup>A</sup> ILAK <sup>I</sup> SR <sup>R</sup> PK <sup>R</sup> RAKTITFS <sup>S</sup> KNAVISK <sup>R</sup> GG <sup>K</sup> LCLLI <sup>R</sup> VA <sup>N</sup>	215
hKir2.1	AVFMVVFQSI <sup>V</sup> GCII <sup>D</sup> AFI <sup>G</sup> AVMAK <sup>M</sup> AK <sup>P</sup> KK <sup>R</sup> NETLVFSSHNAVIAMRDG <sup>K</sup> LCLMWRVGN	216
hKir2.2	AVFMVVAQSI <sup>V</sup> GCII <sup>D</sup> SFMI <sup>G</sup> IAK <sup>M</sup> MAR <sup>P</sup> PK <sup>R</sup> RAQTLLFSSHNAVVALRDG <sup>K</sup> LCLMWRVGN	217
hKir2.3	AVIAVVVQSI <sup>V</sup> GCVIDSFMIGT <sup>I</sup> AK <sup>M</sup> MAR <sup>P</sup> PK <sup>R</sup> RAQTLLFSSHNAVISVRD <sup>G</sup> LCLMWRVGN	208
hKir2.4	AVAAVVLQCI <sup>A</sup> GCVLDAFV <sup>V</sup> GAVMAK <sup>M</sup> AK <sup>P</sup> KK <sup>R</sup> NETLVFSEN <sup>A</sup> VVALRD <sup>H</sup> R <sup>L</sup> LCLMWRVGN	221
Konsensus	*.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	LRKSL <sup>L</sup> LIGS <sup>H</sup> IYG <sup>K</sup> L <sup>L</sup> KT <sup>T</sup> TVTPEGET <sup>I</sup> ILDQININ <sup>F</sup> VVDAGNENLFFISPL <sup>T</sup> IY <sup>H</sup> VIDHN	275
hKir2.1	LRKSHLVEA <sup>H</sup> VR <sup>A</sup> QLK <sup>R</sup> RT <sup>S</sup> ESEGYI <sup>P</sup> LDQIDIVGFD <sup>S</sup> GIDRIFLVSP <sup>I</sup> TIV <sup>H</sup> EIDED	276
hKir2.2	LRKSHIVEA <sup>H</sup> VR <sup>A</sup> QLK <sup>R</sup> RV <sup>T</sup> EEGYI <sup>P</sup> LDQIDIVGFD <sup>S</sup> GKGLDRIFLVSP <sup>I</sup> TIL <sup>H</sup> EIDEA	277
hKir2.3	LRKSHIVEA <sup>H</sup> VR <sup>A</sup> QLK <sup>R</sup> PY <sup>T</sup> QE <sup>E</sup> GYI <sup>P</sup> LDQ <sup>R</sup> DLNVGYDIGLDRIFLVSP <sup>I</sup> TIV <sup>H</sup> EIDED	268
hKir2.4	LRSSHIVEA <sup>H</sup> VR <sup>A</sup> QLK <sup>R</sup> PT <sup>V</sup> PEGYI <sup>P</sup> LDHQD <sup>V</sup> DVGF <sup>D</sup> GGTDRIFLVSP <sup>I</sup> TIV <sup>H</sup> EIDSA	281
Konsensus	*.*.*.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	SPFFHMAAETLLQQDFELVV <sup>F</sup> LDGTVESTSATCQV <sup>R</sup> TSYVPEEVLWGY <sup>R</sup> RFAPIVSKTKEG	335
hKir2.1	SPLYDLSKQDIDNADFEIVVILEGMVEATAMTTQCR <sup>S</sup> SSYLANEILWG <sup>H</sup> RFEVPLFEEKH-	335
hKir2.2	SPLFGISRQDLETDDFEIVVILEGMVEATAMTTQAR <sup>S</sup> SSYLANEILWG <sup>H</sup> RFEVPLFEEKN-	336
hKir2.3	SPLYGMGKEELEDSEDFEIVVILEGMVEATAMTTQAR <sup>S</sup> SSYLA <sup>S</sup> EILWG <sup>H</sup> RFEVPLFEEKS-	327
hKir2.4	SPLYELGRAELARADFEIVVILEGMVEATAMTTQCR <sup>S</sup> SSYLPGE <sup>L</sup> LWG <sup>H</sup> RFEVPLFQRGS-	340
Konsensus	*.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	KYRVDFHNFSKTVEVE-TPHCAMCLYNE----KDVRARMKR-----GYDNPNFILSEV	383
hKir2.1	YYKVDYSRFHKTYEVPNTPLCSARDLAE----KKYILSNAN-----SFCYENEVALTSKE	386
hKir2.2	QYKIDYSHFHKTYEVPSTPRCSAKDLVE----NKFLLPSAN-----SFCYENELAFLSRD	387
hKir2.3	HYKVDYSRFHKTYEVA <sup>G</sup> TPCCSARELQE----SKITVLPA <sup>P</sup> PPPPSAFCYENELALMSQE	383
hKir2.4	QYEVDRHFHRTYEVP <sup>G</sup> TPVCSAKELDERAEQASHSLKSSFP <sup>G</sup> SLTAFCYENELALS <sup>C</sup> Q	400
Konsensus	.....*.*.*.*.*.*	
hROMK1	NETDDTKM-----	391
hKir2.1	EDDS <sup>E</sup> NGVPESTSTDT-----PP-----DIDLHNQASVPLEPR <sup>L</sup> LRRE	424
hKir2.2	EEDEADGDQDGRSRDG-----LSPQARHDFDRLQAGGGVLEQRPYRRE	430
hKir2.3	EEEMEEEEAAAAVAAGIGLEAGSKEEAGIIRMLEFGSHLDLERMQAS-LPLDNISYRRE	442
hKir2.4	EEDEDETEEGNGVET-----EDG-----AASPRVLTPTLALT <sup>L</sup>	434
Konsensus	.....	
hROMK1	-----	391
hKir2.1	SEI-----	427
hKir2.2	SEI-----	433
hKir2.3	SAI-----	445
hKir2.4	PP-----	436
Konsensus	.....	

Abbildung 35: Vergleich der humanen Proteinsequenzen verschiedener Kir-Kanäle (ROMK1: NM\_000220, Kir2.1: NM\_000891, Kir2.2: NM\_021012, Kir2.3: NM\_152868 und Kir2.4: NM\_170720). Die Sternchen in der Konsensussequenz zeigen konservierte Aminosäuren an. Hoch konservierte basische Aminosäuren (L, R, H) sind schwarz. Putative PIP<sub>2</sub>-Bindestellen von ROMK1 und Kir2.1 sind blau unterlegt (Lopes *et al.*, 2002). Aminosäuren, die eine hohe Affinität zu PIP<sub>2</sub> vermitteln, sind grün, und solche, die eine geringe Affinität vermitteln, sind rot unterlegt (Rohács *et al.*, 2002). Die Aminosäure an Position 221 (bezogen auf ROMK1), die für die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> von besonderer Bedeutung ist, ist schwarz umrandet (Du *et al.*, 2004). Die Serine der konservierten, putativen PKA-Phosphorylierungsstellen sind gelb unterlegt (Lopes *et al.*, 2002). Die Aminosäuren der beiden Transmembrandomänen sind unterstrichen.

Für die hier beschriebene Hemmung des ROMK-Stroms durch das koexprimierte GRB7 wäre aber auch ein ganz anderer Mechanismus denkbar. So wurde gezeigt, daß die Oberflächenexpression von ROMK nach Monoubiquitinierung des N-terminalen Lysin 22 (bezogen auf ROMK1) durch eine erhöhte Endozytose vermindert wird (Lin *et al.*, 2005). Bisher ist zwar nicht bekannt, welche Ubiquitinligase die Ubiquitinierung von ROMK vermittelt, jedoch wurde gezeigt, daß Nedd4 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated gene 4; Kumar *et al.*, 1992) im kortikalen Sammelrohr des Nephrons exprimiert wird (Staub *et al.*, 1997a) und dort den epithelialen Natriumkanal ENaC ubiquitiniert (Staub *et al.*, 1997b). Dabei interagiert Nedd4 mit Hilfe seiner WW(Tryptophan-Tryptophan)-Domänen direkt mit den PY(Prolin-Tyrosin)-Motiven der drei ENaC-Untereinheiten (Staub *et al.*, 1996). Ein anderes Substrat dieser Ubiquitinligase ist der IGF I (Insulin-like growth factor I)-Rezeptor, der nach der Ubiquitinierung ebenfalls endozytiert wird. Der IGF I-Rezeptor und ROMK verfügen allerdings über keine PY-Motive für eine direkte Interaktion mit Nedd4. Im Fall des Rezeptors fungiert das verwandte GRB10 als Adapterprotein (Vecchione *et al.*, 2003), das zusammen mit GRB7 und GRB14 eine Proteinfamilie bildet. Für GRB10 und GRB14 wurde bereits gezeigt, daß sie über ihre SH2(src-Homologie 2)-Domäne mit Nedd4 interagieren und so die Ubiquitinligase in räumliche Nähe zu ihren Substraten bringen, selbst aber nicht ubiquitiniert werden (Morrione *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 2001). Es wäre daher möglich, daß GRB7 das in Oozyten endogen vorhandene Nedd4 bindet und durch Interaktion mit ROMK dessen Ubiquitinierung stimuliert und als Folge davon eine Reduktion der Oberflächenexpression des Kanalproteins hervorruft.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zeigen erstmalig einen Einfluß von GRB7 auf die Funktion von ROMK und die der verwandten Kir2.1- und Kir2.4-Kanäle. Sie lassen aber bislang noch keine gesicherten Aussagen über eine mögliche physiologische Bedeutung dieser neu gefundenen regulatorischen Interaktion zu. Für den zukünftigen Nachweis der physiologischen Relevanz sowie für die mögliche Rolle von PIP<sub>2</sub> und Nedd4 bei der Regulation der Kir-Kanäle durch das Adapterprotein wären auch Kanalmutanten, bei denen die für die Ubiquitinierung bzw. die Bindung des Phospholipids wichtigen Aminosäuren ausgetauscht sind, sehr hilfreich.



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Interaktionspartner des einwärtsrektifizierenden, renalen ROMK-Kaliumkanals identifiziert und funktionell in *Xenopus* Oozyten untersucht. Zunächst wurde mit Hilfe eines modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und dem zytosolischen C-Terminus von ROMK als Köderprotein eine cDNS-Bibliothek der humanen Niere durchmustert. Eine Besonderheit hierbei war, daß das Köderprotein im Gegensatz zu dem herkömmlichen Hefe-Zwei-Hybrid-System in der nativen, tetrameren Konformation vorlag. Die Interaktion der isolierten Proteine mit dem ROMK-C-Terminus wurde anschließend in der Hefe in direkten Bindungsstudien bestätigt. Auf diese Weise konnten 25 neue Interaktionspartner für ROMK gefunden werden. Aufgrund ihrer teilweise bekannten Funktionen und Strukturen wurden einige, insbesondere das Golgi-Protein Golgin-160, das Adapterprotein GRB7 und die Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Untereinheit PP2A B56 $\beta$ , für eine weitergehende Charakterisierung ausgewählt.

Die vermutete Beteiligung von Golgin-160 am vesikulären Membrantransport machte die gefundene Interaktion mit ROMK besonders interessant, da über den Transport des Kanals vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis an die Zelloberfläche nur wenig bekannt ist. Zunächst konnte die Bindung von Golgin-160 an das ROMK Kanalprotein durch Koimmunpräzipitation beider Proteine aus Lysaten transfizierter Säugerzellen unterstützt werden. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigten weiterhin, daß beide Proteine tatsächlich und ausschließlich im Bereich des Golgi-Apparats kolokalisiert sind. Dies verstärkte die Vermutung, daß Golgin-160 am Membrantransport von ROMK beteiligt ist. Funktionelle Untersuchungen in *Xenopus* Oozyten mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ergaben nach Koexpression beider Proteine reproduzierbar eine Verdopplung der ROMK-Stromamplitude. Mittels einer Chemolumineszenz-Oberflächenexpressionsanalyse konnte dies auf eine Zunahme der Dichte des Kanalproteins in der Plasmamembran zurückgeführt werden. Ähnliche Resultate wurden auch für das nahe verwandte Kir2.1-Kanalprotein erhalten. Diese Untersuchungen zeigten zudem, daß nur das Kanalprotein an der Zelloberfläche, nicht aber die Gesamtmenge des Proteins in der Zelle erhöht war. Dementsprechend waren auch die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des ROMK-Kanals durch das koexprimierte Golgin-160 nicht verändert.

Um die Bedeutung der gefundenen Interaktion näher zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit C-terminalen Bartter-Mutanten von ROMK durchgeführt. Alle untersuchten Punkt- und Trunktionsmutanten waren noch zur Bindung von Golgin-160 fähig, und zwei Punktmutanten konnten durch Golgin-160 auch funktionell stimuliert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß diese hochkonservierten Aminosäurereste des Kanalproteins nicht an der Bindung von Golgin-160 beteiligt sind, und daß der defekte Membrantransport dieser krankheitsverursachenden Mutanten nicht auf einer gestörten Interaktion mit dem untersuchten Golgi-Protein beruht.

Mit diesen Untersuchungen wurde erstmalig gezeigt, daß Golgin-160 am Golgi-Apparat selektiv mit transportierten Membranproteinen interagiert und dadurch deren Zelloberflächenexpression reguliert. Eine spezifische Rolle beim Transport von Oberflächenproteinen zur Plasmamembran wird durch das Ergebnis unterstrichen, daß auch die Oberflächenexpression der entfernt verwandten Kv1.5- und Kv4.3-Kanalproteine stimuliert wird, aber nicht die des HERG-Kaliumkanals.

In weiteren funktionellen Untersuchungen konnten auch für GRB7 und PP2A B56 $\beta$  erstmalig Einflüsse auf die ROMK-Kanalaktivität gezeigt werden. Die Koexpression von GRB7 führte sowohl bei ROMK als auch bei verwandten Kir2-Kanalproteinen zu einer Verringerung der Stromamplitude. Bei PP2A B56 $\beta$  war der Effekt von der Expressionshöhe dieser regulatorischen Phosphatase-Untereinheit abhängig. So waren die ROMK-Ströme bei geringen Mengen an injizierter PP2A B56 $\beta$  erhöht, nach Injektion größerer Mengen dagegen reduziert.

Die Regulation der ROMK-Kanalaktivität wird größtenteils durch die Kontrolle der Kanaldichte an der Zelloberfläche erzielt. Da unterschiedliche Signalwege die Häufigkeit des Kanalproteins an der Zelloberfläche modulieren können, kann vermutet werden, daß nicht nur Golgin-160 sondern auch GRB7 und PP2A B56 $\beta$  an der Regulation der Oberflächenexpression von ROMK beteiligt sind (Abb. 36). Die Identifizierung dieser neuen Interaktionspartner stellt deshalb einen ersten wichtigen Schritt bei der Aufklärung der dieser Regulation zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dar.

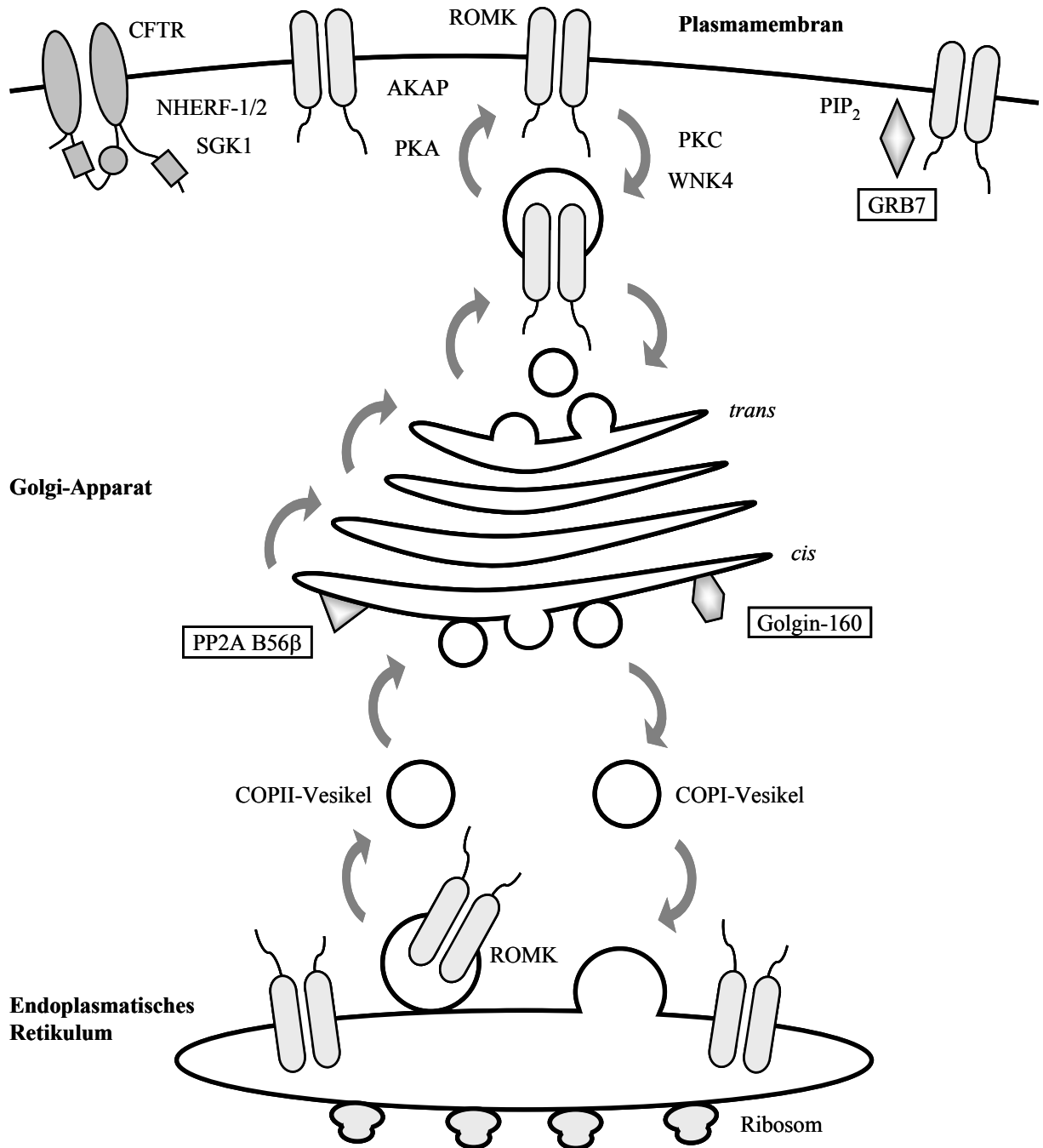


Abbildung 36: Schematische Darstellung des sekretorischen Weges von ROMK und Lokalisation der bekannten regulatorischen Proteine, sowie der identifizierten Interaktionspartner Golgin-160, PP2A B56 $\beta$  und GRB7. ROMK wird an den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert und nach Faltung und Tetramerisierung mit Hilfe von COPII-Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Kanalproteine, die falsch gefaltet oder unvollständig zusammengesetzt wurden, werden über COPI-Vesikel zurück zum ER gebracht. Im Golgi-Apparat wird das ROMK-Protein glykosyliert und schließlich über Transportvesikel zur Plasmamembran gebracht. An der Regulation von ROMK ist eine Reihe von Proteinen beteiligt, die im Text ausführlich beschrieben werden. Abkürzungen: AKAP, A Kinase Anchoring Protein; CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator; NHERF, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor; PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKA, Protein Kinase A; PKC, Protein Kinase C; SGK1, Serum- und Glucocorticoid-induzierte Kinase; WNK4, With No Lysin (K) 4.

## 6 Literatur

Abbott A. The society of proteins. *Nature* 417: 894-896, 2002.

Abriel H, Motoike H, Kass RS. KChAP: a novel chaperone for specific K<sup>+</sup> channels key to repolarization of the cardiac action potential. Focus on "KChAP as a chaperone for specific K<sup>+</sup> channels". *Am J Physiol Cell Physiol* 278: 863-864, 2000.

Ali S, Chen X, Lu M, Xu JZ, Lerea KM, Hebert SC, Wang WH. The A kinase anchoring protein is required for mediating the effect of protein kinase A on ROMK1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10274-10278, 1998.

Alvarez C, Garcia-Mata R, Hauri HP, Sztul E. The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J Biol Chem* 276: 2693-2700, 2001.

Ammälä C, Moorhouse A, Gribble F, Ashfield R, Proks P, Smith PA, Sakura H, Coles B, Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* 379: 545-548, 1996.

An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403: 553-556, 2000.

Bahring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvbeta subunits. *J Biol Chem* 276: 22923-22929, 2001.

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384: 78-80, 1996.

Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, Warren G. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* 91: 253-262, 1997.

Barr FA, Nakamura N, Warren G. Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *Embo J* 17: 3258-3268, 1998.

Barr FA, Short B. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 15: 405-413, 2003.

Barry PH, Lynch JW. Ligand-gated channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 4: 70-80, 2005.

Bartter PC, Pronove P, Gill JR, MacCardle RC (with tech. assistance of Diller E): Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Amer J Med* 33: 811-828, 1962.

Bianchi L, Shen Z, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Ronchetti E, Bryskin R, Schwartz PJ, Brown AM. Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 8: 1499-1507, 1999.

Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol* 10: 456-461, 2000.

BirkenhagerR, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 29: 310-314, 2001.

Bleich M, Schlatter E, Greger R. The luminal K<sup>+</sup> channel of the thick ascending limb of Henle's loop. *Pflugers Arch* 415: 449-460, 1990.

Bock JH, Shuck ME, Benjamin CW, Chee M, Bienkowski MJ, Slightom JL. Nucleotide sequence analysis of the human KCNJ1 potassium channel locus. *Gene* 188: 9-16, 1997.

Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol* 268: F1132-1140, 1995.

Bond CT, Pessia M, Xia XM, Lagrutta A, Kavanaugh MP, Adelman JP. Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels* 2: 183-191, 1994.

Brahmachari SK, Meera G, Sarkar PS, Balagurumoorthy P, Tripathi J, Raghavan S, Shaligram U, Pataskar S. Simple repetitive sequences in the genome: structure and functional significance. *Electrophoresis* 16: 1705-1714, 1995.

Brejon M, Le Maout S, Welling PA, Merot J. Processing and transport of ROMK1 channel is temperature-sensitive. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 364-371, 1999.

Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* 275: 6453-6461, 2000.

Brenner R, Chen QH, Vilaythong A, Toney GM, Noebels JL, Aldrich RW. BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci* 8: 1752-1759, 2005.

Bröer S, Wagner CA. Membrane transporter diseases. *Kluwer Academi / Plenum Publishers, New York*, 2004.

Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398: 80-84, 1999.

Cassola AC, Giebisch G, Wang W. Vasopressin increases density of apical low-conductance K<sup>+</sup> channels in rat CCD. *Am J Physiol* 264: F502-509, 1993.

Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64: 493-531, 1995.

Cha H, Smith BL, Gallo K, Machamer CE, Shapiro P. Phosphorylation of golgin-160 by mixed lineage kinase 3. *J Cell Sci* 117: 751-760, 2004.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805, 1994.

Cheng J, Wang H, Guggino WB. Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem* 279: 1892-1898, 2004.

Cheng J, Wang H, Guggino WB. Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10. *J Biol Chem* 280: 3731-3739, 2005.

Choe H, Zhou H, Palmer LG, Sackin H. A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *Am J Physiol* 273: F516-529, 1997.

- Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3: 115-121, 2002.
- Chu PY, Quigley R, Babich V, Huang CL. Dietary potassium restriction stimulates endocytosis of ROMK channel in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1179-1187, 2003.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278: 1803-1805, 1997.
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K<sup>+</sup> channel by dual pathways. *Curr Biol* 10: 671-674, 2000.
- Cook KK, Fadool DA. Two adaptor proteins differentially modulate the phosphorylation and biophysics of Kv1.3 ion channel by SRC kinase. *J Biol Chem* 277: 13268-13280, 2002.
- Cox DH, Aldrich RW. Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity. *J Gen Physiol* 116: 411-432, 2000.
- Dahlmann A, Li M, Gao Z, McGarrigle D, Sackin H, Palmer LG. Regulation of Kir channels by intracellular pH and extracellular K<sup>+</sup>: mechanisms of coupling. *J Gen Physiol* 123: 441-454, 2004.
- Daly RJ. The Grb7 family of signalling proteins. *Cell Signal* 10: 613-618, 1998.
- Dascal, N. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev in Biochem*, 22: 317-387, 1987.
- Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraïbi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na<sup>+</sup> channel cell surface expression. *EMBO J* 20: 7052-7059, 2001.
- Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yuksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 52: 255-264, 2001.
- Decher N, Bundis F, Vajna R, Steinmeyer K. KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflugers Arch* 446: 633-640, 2003.

Derst C, Konrad M, Kockerling A, Karolyi L, Deschenes G, Daut J, Karschin A, Seyberth HW. Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K<sup>+</sup> channel function. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 641-645, 1997.

Doi T, Fakler B, Schultz JH, Ehmke H, Brandle U, Zenner HP, Sussbrich H, Lang F, Ruppersberg JP, Busch AE. Subunit-specific inhibition of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels by quinidine. *FEBS Lett* 375: 193-196, 1995.

Doi T, Fakler B, Schultz JH, Schulte U, Brandle U, Weidemann S, Zenner HP, Lang F, Ruppersberg JP. Extracellular K<sup>+</sup> and intracellular pH allosterically regulate renal Kir1.1 channels. *J Biol Chem* 271: 17261-17266, 1996.

Dong K, Xu J, Vanoye CG, Welch R, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC. An amino acid triplet in the NH<sub>2</sub> terminus of rat ROMK1 determines interaction with SUR2B. *J Biol Chem* 276: 44347-44353, 2001.

Dong K, Tang L, MacGregor GG, Hebert SC. Localization of the ATP/phosphatidylinositol 4,5 diphosphate-binding site to a 39-amino acid region of the carboxyl terminus of the ATP-regulated K<sup>+</sup> channel Kir1.1. *J Biol Chem* 277: 49366-49373, 2002.

Doring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci* 18: 8625-8636, 1998.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145, 1988.

Dower WJ. Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. *Genet Eng (NY)* 12: 275-295, 1990.

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77, 1998.

Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, Logothetis DE. Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem* 279: 37271-37281, 2004.



- Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. *Mol Membr Biol* 20: 197-207, 2003.
- Eaton DC, Malik B, Saxena NC, Al-Khalili OK, Yue G. Mechanisms of aldosterone's action on epithelial Na<sup>+</sup> transport. *J Membr Biol* 184: 313-319, 2001.
- Eldstrom J, Choi WS, Steele DF, Fedida D. SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett* 547: 205-211, 2003.
- Estevez R, Boettger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414: 558-561, 2001.
- Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppersberg JP. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *Embo J* 15: 4093-4099, 1996.
- Fathallah-Shaykh H, Wolf S, Wong E, Posner JB, Furneaux HM. Cloning of a leucine-zipper protein recognized by the sera of patients with antibody-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3451-3454, 1991.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* 266: 1068-1072, 1994.
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246, 1989.
- Fritzler MJ, Hamel JC, Ochs RL, Chan EK. Molecular characterization of two human autoantigens: unique cDNAs encoding 95- and 160-kD proteins of a putative family in the Golgi complex. *J Exp Med* 178: 49-62, 1993.
- Fujita A, Kurachi Y. SAP family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 1-6, 2000.
- Fujiwara Y, Kubo Y. Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 120: 677-693, 2002.

- Gentzsch M, Cui L, Mengos A, Chang XB, Chen JH, Riordan JR. The PDZ-binding chloride channel CIC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J Biol Chem* 278: 6440-6449, 2003.
- Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 19: 349-353, 1994.
- Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 274: F817-833, 1998.
- Gillingham AK, Munro S. Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1641: 71-85, 2003.
- Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Rucker-Martin C, Goyenvalle C, Abdelshafy S, Tessier S, Couetil JP, Hatem N. Expression, regulation and role of the MAGUK protein SAP-97 in human atrial myocardium. *Cardiovasc Res* 56: 433-442, 2002.
- Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2: 175-184, 2001.
- Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65: 760-797, 1985.
- Gussow, D, T. Clackson. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 4000, 1989.
- Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 81: 685-740, 2001.
- Hamilton SL, Serysheva I, Strasburg GM. Calmodulin and Excitation-Contraction Coupling. *News Physiol Sci* 15: 281-284, 2000.
- Han DC, Shen TL, Guan JL. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* 20: 6315-6321, 2001.
- Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262: 1401-1407, 1993.

- Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 85: 319-371, 2005.
- Hicks SW, Machamer CE. The NH<sub>2</sub>-terminal domain of Golgin-160 contains both Golgi and nuclear targeting information. *J Biol Chem* 277: 35833-35839, 2002.
- Hicks SW, Machamer CE. Isoform-specific interaction of golgin-160 with the Golgi-associated protein PIST. *J Biol Chem* 280: 28944-28951, 2005.
- Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* 273: 956-959, 1996.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP<sub>2</sub> with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001: RE19, 2001.
- Hirokawa N, Takemura R. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* 301: 50-59, 2004.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-38, 1993.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59, 1989.
- Hollmann M, Maron C, Heinemann S. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13: 1331-1343, 1994.
- Horio Y, Hibino H, Inanobe A, Yamada M, Ishii M, Tada Y, Satoh E, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y. Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J Biol Chem* 272: 12885-12888, 1997.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 391: 803-806, 1998.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1170, 1995.

Ito A, Koma Y, Sohda M, Watabe K, Nagano T, Misumi Y, Nojima H, Kitamura Y. Localization of the PP2A B56gamma regulatory subunit at the Golgi complex: possible role in vesicle transport and migration. *Am J Pathol* 162: 479-489, 2003.

Jackson PK. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 15: 3088-3103, 2001.

Jeck N, Derst C, Wischmeyer E, Ott H, Weber S, Rudin C, Seyberth HW, Daut J, Karschin A, Konrad M. Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome. *Kidney Int* 59: 1803-1811, 2001.

Jenke M, Sanchez A, Monje F, Stuhmer W, Weseloh RM, Pardo LA. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J* 22: 395-403, 2003.

Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K<sup>+</sup> secretion. *Nat Genet* 35: 372-376, 2003.

Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2046-2051, 2004.

Kanki H, Kupersmidt S, Yang T, Wells S, Roden DM. A structural requirement for processing the cardiac K<sup>+</sup> channel KCNQ1. *J Biol Chem* 279: 33976-33983, 2004.

Karolyi L, Kockerling A, Ziegler A, Zimmermann DK, Roth B, Wieg C, Grzeschik KH, Koch MC, Seyberth HW, Vargus R, Forestier L, Jean G, Deschaux M, Rizzoni GF, Niaudet P, Antignac C, Feldman D, Lorridon F, Cougoureux E, Laroze F, Alessandri JL, David L, Saunier P, Deschenes G, Hildebrandt F, Vollmer M, Proesmans W, Brandis M, van den Heuvel LPWJ, Lemmink HH, Nillesen W, Monnens LAH, Knoers NVAM, Guay-Woodford LM, Wright CJ, Madrigal G, Hebert SC. Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes. *Hum Mol Genet* 6: 17-26, 1997.

Kassenbrock CK, Anderson SM. Regulation of ubiquitin protein ligase activity in c-Cbl by phosphorylation-induced conformational change and constitutive activation by tyrosine to glutamate point mutations. *J Biol Chem* 279: 28017-28027, 2004.

Kasus-Jacobi A, Bereziat V, Perdereau D, Girard J, Burnol AF. Evidence for an interaction between the insulin receptor and Grb7. A role for two of its binding domains, PIR and SH2. *Oncogene* 19: 2052-2059, 2000.

Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14: 231-241, 2000.

Kim DW, Sacher M, Scarpa A, Quinn AM, Ferro-Novick S. High-copy suppressor analysis reveals a physical interaction between Sec34p and Sec35p, a protein implicated in vesicle docking. *Mol Biol Cell* 10: 3317-3329, 1999.

Kim DW. Characterization of Grp1p, a novel cis-Golgi matrix protein. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 370-378, 2003.

Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA. Ito channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 279: 5549-5554, 2004.

Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26: 221-229, 2006.

Kohda Y, Ding W, Phan E, Housini I, Wang J, Star RA, Huang CL. Localization of the ROMK potassium channel to the apical membrane of distal nephron in rat kidney. *Kidney Int* 54: 1214-1223, 1998.

Kondo C, Isomoto S, Matsumoto S, Yamada M, Horio Y, Yamashita S, Takemura-Kameda K, Matsuzawa Y, Kurachi Y. Cloning and functional expression of a novel isoform of ROMK inwardly rectifying ATP-dependent K<sup>+</sup> channel, ROMK6 (Kir1.1f). *FEBS Lett* 399: 122-126, 1996.

Konstas AA, Dabrowski M, Korbmacher C, Tucker SJ. Intrinsic sensitivity of Kir1.1 (ROMK) to glibenclamide in the absence of SUR2B. Implications for the identity of the renal ATP-regulated secretory K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 277: 21346-21351, 2002.

Konstas AA, Koch JP, Tucker SJ, Korbmacher C. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K<sup>+</sup> channels by the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 277: 25377-25384, 2002.

- Konstas AA, Korbmacher C, Tucker SJ. Identification of domains which control the heteromeric assembly of Kir5.1/Kir40 potassium channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C910-917, 2003.
- Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham DE. A novel inward rectifier K<sup>+</sup> channel with unique pore properties. *Neuron* 20: 995-1005, 1998.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-133, 1993.
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 1155-1161, 1992.
- Kung C. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436: 647-654, 2005.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300: 1922-1926, 2003.
- Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C931-941, 2000.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Lambert G, Becker B, Schreiber R, Boucherot A, Reth M, Kunzelmann K. Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression by BAP31. *J Biol Chem* 276: 20340-20345, 2001.
- Leavey SF, Arend LJ, Dare H, Dressler GR, Briggs JP, Margolis BL. Expression of Grb7 growth factor receptor signaling protein in kidney development and in adult kidney. *Am J Physiol* 275: F770-776, 1998.
- Leipziger J, MacGregor GG, Cooper GJ, Xu J, Hebert SC, Giebisch G. PKA site mutations of ROMK2 channels shift the pH dependence to more alkaline values. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F919-926, 2000.
- Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350: 1-18, 2000.

Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 513: 71-76, 2002.

Leng Q, MacGregor GG, Dong K, Giebisch G, Hebert SC. Subunit-subunit interactions are critical for proton sensitivity of ROMK: evidence in support of an intermolecular gating mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1982-1987, 2006.

Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 114: 987-998, 2001.

Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR 3rd, Vandenberg CA. Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 279: 22331-22346, 2004.

Lerche C, Seeböhm G, Wagner CI, Scherer CR, Dehmelt L, Abitbol I, Gerlach U, Brendel J, Attali B, Busch AE. Molecular impact of MinK on the enantiospecific block of I(Ks) by chromanols. *Br J Pharmacol* 131: 1503-1506, 2000.

Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* 15: 1004-1011, 1996a.

Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E, Lazdunski M. Dimerization of TWIK-1 K<sup>+</sup> channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J* 15: 6400-6407, 1996b.

Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F793-801, 2000.

Li D, Wei Y, Babilonia E, Wang Z, Wang WH. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase stimulates activity of the small-conductance K channel in the CCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F806-812, 2006.

Li H, Sanchez-Torres J, del Carpio AF, Nogales-Gonzalez A, Molina-Ortiz P, Moreno MJ, Torok K, Villalobo A. The adaptor Grb7 is a novel calmodulin-binding protein: functional implications of the interaction of calmodulin with Grb7. *Oncogene* 24: 4206-4219, 2005.

- Lin DH, Sterling H, Lerea KM, Giebisch G, Wang WH. Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface expression of ROMK1 channels. *J Biol Chem* 277: 44278-44284, 2002a.
- Lin DH, Sterling H, Lerea KM, Welling P, Jin L, Giebisch G, Wang WH. K depletion increases protein tyrosine kinase-mediated phosphorylation of ROMK. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F671-677, 2002b.
- Lin DH, Sterling H, Yang B, Hebert SC, Giebisch G, Wang WH. Protein tyrosine kinase is expressed and regulates ROMK1 location in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F881-892, 2004.
- Lin DH, Sterling H, Wang Z, Babilonia E, Yang B, Dong K, Hebert SC, Giebisch G, Wang WH. ROMK1 channel activity is regulated by monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4306-4311, 2005.
- Liou HH, Zhou SS, Huang CL. Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5820-5825, 1999.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309: 897-903, 2005.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372: 366-369, 1994.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol* 106: 923-955, 1995.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34: 933-944, 2002.
- Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, Manning PA, Liu LH, Miller ML, Shull GE. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem* 277: 37871-37880, 2002.



- Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, Bens M, Tanemoto M, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J. An inward rectifier K<sup>+</sup> channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *J Physiol* 538: 391-404, 2002.
- Lowe M, Gonatas NK, Warren G. The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130. *J Cell Biol* 149: 341-356, 2000.
- Lu M, Zhu Y, Balazy M, Reddy KM, Falck JR, Wang W. Effect of angiotensin II on the apical K<sup>+</sup> channel in the thick ascending limb of the rat kidney. *J Gen Physiol* 108: 537-547, 1996.
- Lu M, Wang T, Yan Q, Yang X, Dong K, Knepper MA, Wang W, Giebisch G, Shull GE, Hebert SC. Absence of small conductance K<sup>+</sup> channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice. *J Biol Chem* 277: 37881-37887, 2002.
- Lu M, Wang T, Yan Q, Wang W, Giebisch G, Hebert SC. ROMK is required for expression of the 70-pS K channel in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F490-495, 2004a.
- Lu M, Leng Q, Egan ME, Caplan MJ, Boulpaep EL, Giebisch GH, Hebert SC. CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest* 116: 797-807, 2006.
- Lu Z. Mechanism of rectification in inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Annu Rev Physiol* 66: 103-129, 2004b.
- Lyons RJ, Deane R, Lynch DK, Ye ZS, Sanderson GM, Eyre HJ, Sutherland GR, Daly RJ. Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem* 276: 17172-17180, 2001.
- Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291: 316-319, 2001.
- MacGregor GG, Xu JZ, McNicholas CM, Giebisch G, Hebert SC. Partially active channels produced by PKA site mutation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK2 (Kir1.2). *Am J Physiol* 275: F415-422, 1998.

Macica CM, Yang Y, Hebert SC, Wang WH. Arachidonic acid inhibits activity of cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK1. *Am J Physiol* 271: F588-594, 1996.

Macica CM, Yang Y, Lerea K, Hebert SC, Wang W. Role of the NH<sub>2</sub> terminus of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK1, in arachidonic acid-mediated inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F175-181, 1997.

Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 149: 603-612, 2000.

Margolis B, Silvennoinen O, Comoglio F, Roonprapunt C, Skolnik E, Ullrich A, Schlessinger J. High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8894-8898, 1992.

McCright B, Virshup DM. Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J Biol Chem* 270: 26123-26128, 1995.

McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* 271: 22081-22089, 1996a.

McCright B, Brothman AR, Virshup DM. Assignment of human protein phosphatase 2A regulatory subunit genes b56alpha, b56beta, b56gamma, b56delta, and b56epsilon (PPP2R5A- PP2R5E), highly expressed in muscle and brain, to chromosome regions 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1, and 7p11.2-p12. *Genomics* 36: 168-170, 1996b.

McNicholas CM, Wang W, Ho K, Hebert SC, Giebisch G. Regulation of ROMK1 K<sup>+</sup> channel activity involves phosphorylation processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8077-8081, 1994.

McNicholas CM, Yang Y, Giebisch G, Hebert SC. Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2). *Am J Physiol* 271: F275-285, 1996a.

McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound, glibenclamide, is enhanced by co-expression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8083-8088, 1996b.

- McNicholas CM, MacGregor GG, Islas LD, Yang Y, Hebert SC, Giebisch G. pH-dependent modulation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Am J Physiol* 275: F972-981, 1998.
- Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5562-5567, 2000.
- Mennitt PA, Wade JB, Ecelbarger CA, Palmer LG, Frindt G. Localization of ROMK channels in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 8: 1823-1830, 1997.
- Misumi Y, Sohda M, Yano A, Fujiwara T, Ikehara Y. Molecular characterization of GCP170, a 170-kDa protein associated with the cytoplasmic face of the Golgi membrane. *J Biol Chem* 272: 23851-23858, 1997.
- Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268: 247-251, 1995.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9926-9930, 1994.
- Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S, Gu R, Huang XY, Hebert SC, Giebisch G, Wang WH. Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 276: 7156-7163, 2001.
- Morrione A, Plant P, Valentinis B, Staub O, Kumar S, Rotin D, Baserga R. mGrb10 interacts with Nedd4. *J Biol Chem* 274: 24094-24099, 1999.
- Moyer BD, Allan BB, Balch WE. Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* 2: 268-276, 2001.
- Murshid A, Presley JF. ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 133-145, 2004.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 37: 449-461, 2003.

- Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 131: 1715-1726, 1995.
- Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G. The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* 89: 445-455, 1997.
- Nakamura N, Suzuki Y, Sakuta H, Ookata K, Kawahara K, Hirose S. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells: implication for a functional coupling with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem J* 342: 329-336, 1999.
- Neudauer CL, Joberty G, Macara IG. PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 541-547, 2001.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification. Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 18 Å resolution. *Cell* 111: 957-965, 2002.
- O'Connell AD, Leng Q, Dong K, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC. Phosphorylation-regulated endoplasmic reticulum retention signal in the renal outer-medullary K<sup>+</sup> channel (ROMK). *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9954-9959, 2005.
- Ohta E, Misumi Y, Sohda M, Fujiwara T, Yano A, Ikehara Y. Identification and characterization of GCP16, a novel acylated Golgi protein that interacts with GCP170. *J Biol Chem* 278: 51957-51967, 2003.
- Ookata K, Tojo A, Suzuki Y, Nakamura N, Kimura K, Wilcox CS, Hirose S. Localization of inward rectifier potassium channel Kir7.1 in the basolateral membrane of distal nephron and collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 11: 1987-1994, 2000.
- Palmada M, Embark HM, Wyatt AW, Bohmer C, Lang F. Negative charge at the consensus sequence for the serum- and glucocorticoid-inducible kinase, SGK1, determines pH sensitivity of the renal outer medullary K<sup>+</sup> channel, ROMK1. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 967-972, 2003.
- Palmer LG, Choe H, Frindt G. Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *Am J Physiol* 273: F404-410, 1997.

- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237: 749-753, 1987.
- Parker LT, Zakeri H, Deng Q, Spurgeon S, Kwok PY, Nickerson DA. AmpliTaq DNA polymerase, FS dye-terminator sequencing: analysis of peak height patterns. *Biotechniques* 21: 694-699, 1996.
- Partiseti M, Collura V, Agnel M, Culouscou JM, Graham D. Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett* 434: 171-176, 1998.
- Pawson T, Gish GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71: 359-362, 1992.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 8: 279-287, 2005. Erratum in: *Nat Neurosci* 8: 835, 2005.
- Peters M, Ermert S, Jeck N, Derst C, Pechmann U, Weber S, Schlingmann KP, Seyberth HW, Waldegger S, Konrad M. Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int* 64: 923-932, 2003.
- Pietsch EC, Chan JY, Torti FM, Torti SV. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem* 278: 2361-2369, 2003.
- Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF. Functional and molecular aspects of voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci* 868: 344-355, 1999.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233, 1992.
- Rapedius M, Haider S, Browne KF, Shang L, Sansom MS, Baukrowitz T, Tucker SJ. Structural and functional analysis of the putative pH sensor in the Kir1.1 (ROMK) potassium channel. *EMBO Rep* 7: 611-616, 2006.
- Rickard JE, Kreis TE. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol* 6: 178-183, 1996.

- Rohacs T, Lopes C, Mirshahi T, Jin T, Zhang H, Logothetis DE. Assaying phosphatidylinositol bisphosphate regulation of potassium channels. *Methods Enzymol* 345: 71-92, 2002.
- Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 745-550, 2003.
- Roti Roti EC, Myers CD, Ayers RA, Boatman DE, Delfosse SA, Chan EK, Ackerman MJ, January CT, Robertson GA. Interaction with GM130 during HERG ion channel trafficking. Disruption by type 2 congenital long QT syndrome mutations. Human Ether-a-go-go-Related Gene. *J Biol Chem* 277: 47779-47785, 2002.
- Ruknudin A, Schulze DH, Sullivan SK, Lederer WJ, Welling PA. Novel subunit composition of a renal epithelial  $K_{ATP}$  channel. *J Biol Chem* 273: 14165-14171, 1998.
- Sackin H, Syn S, Palmer LG, Choe H, Walters DE. Regulation of ROMK by extracellular cations. *Biophys J* 80: 683-697, 2001.
- Sackin H, Nanazashvili M, Palmer LG, Krambis M, Walters DE. Structural locus of the pH gate in the Kir1.1 inward rectifier channel. *Biophys J* 88: 2597-2606, 2005.
- Sackin H, Nanazashvili M, Palmer LG, Li H. Role of conserved glycines in pH gating of Kir1.1 (ROMK). *Biophys J* 90: 3582-3589, 2006.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
- Sakai K, Shirakawa T, Li Y, Kitagawa Y, Hirose G. Interaction of a paraneoplastic cerebellar degeneration-associated neuronal protein with the nuclear helix-loop-helix leucine zipper protein MRG X. *Mol Cell Neurosci* 19: 477-484, 2002.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977.

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384: 80-83, 1996.

Sapperstein SK, Walter DM, Grosvenor AR, Heuser JE, Waters MG. p115 is a general vesicular transport factor related to the yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Usa1p. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 522-526, 1995.

Schlatter E, Bleich M, Hirsch J, Greger R. pH-sensitive K<sup>+</sup> channels in the distal nephron. *Nephrol Dialysis Transplant* 8: 488-490, 1993.

Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppertsberg JP, Fakler B, Ludwig J. pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15298-15303, 1999.

Schulte U, Weidemann S, Ludwig J, Ruppertsberg J, Fakler B. K<sup>+</sup>-dependent gating of K(ir)1.1 channels is linked to pH gating through a conformational change in the pore. *J Physiol* 534: 49-58, 2001.

Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T. A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K<sup>+</sup> channel assembly. *EMBO Rep* 4: 76-81, 2003.

Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 112: 651-663, 1998.

Shen TL, Han DC, Guan JL. Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J Biol Chem* 277: 29069-29077, 2002.

Shen TL, Guan JL. Grb7 in intracellular signaling and its role in cell regulation. *Front Biosci* 9: 192-200, 2004.

Shenolikar S, Weinman EJ. NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F389-395, 2001.

Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, Tsai TD, Lee KS, Slightom JL, Bienkowski MJ. Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROM-K potassium channel. *J Biol Chem* 269: 24261-24270, 1994.

Shuck ME, Piser TM, Bock JH, Slightom JL, Lee KS, Bienkowski MJ. Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3). *J Biol Chem* 272: 586-593, 1997.

Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of PIP<sub>2</sub> regulation of inward rectifier K<sub>ATP</sub> channels. *J Gen Physiol* 116: 599-608, 2000.

Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genet* 13: 183-188, 1996a.

Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nat Genet* 14: 152-156, 1996b.

Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonça E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genet* 17: 171-178, 1997.

Simon DB, Lifton RP. Mutations in Na(K)Cl transporters in Gitelman's and Bartter's syndromes. *Curr Opin Cell Biol* 10: 450-454, 1998.

Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikehara Y. Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* 276: 45298-45306, 2001.

Starremans PG, van der Kemp AW, Knoers NV, van den Heuvel LP, Bindels RJ. Functional implications of mutations in the human renal outer medullary potassium channel (ROMK2) identified in Bartter syndrome. *Pflugers Arch* 443: 466-472, 2002.

Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J* 15: 2371-2380, 1996.



Staub O, Yeager H, Plant PJ, Kim H, Ernst SA, Rotin D. Immunolocalization of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 in tissues expressing the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC). *Am J Physiol* 272: C1871-1880, 1997a.

Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D. Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J* 16: 6325-6336, 1997b.

Sterling H, Lin DH, Gu RM, Dong K, Hebert SC, Wang WH. Inhibition of protein-tyrosine phosphatase stimulates the dynamin-dependent endocytosis of ROMK1. *J Biol Chem* 277: 4317-4323, 2002.

Sterling H, Lin DH, Wei Y, Wang WH. Tetanus toxin abolishes exocytosis of ROMK1 induced by inhibition of protein tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F510-517, 2003.

Stühmer MJ, Terlau H, Heinemann SH. Xenopus oocytes for two-electrode and patch clamp recording, in *Practical Electrophysiological Methods*, eds. Grantyn, R, Kettenmann, H. *Wiley-Liss, New York*: 121-129, 1992.

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847-850, 1995.

Syme CA, Hamilton KL, Jones HM, Gerlach AC, Giltinan L, Papworth GD, Watkins SC, Bradbury NA, Devor DC. Trafficking of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, hIK1, is dependent upon a C-terminal leucine zipper. *J Biol Chem* 278: 8476-8486, 2003.

Tagliatela M, Ficker E, Wible BA, Brown AM. C-terminus determinants for Mg<sup>2+</sup> and polyamine block of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel IRK1. *EMBO J* 14: 5532-5541, 1995.

Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 242: 1042-1045, 1988.

Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K<sup>+</sup> channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 525: 587-592, 2000a.

Tanemoto M, Vanoye CG, Dong K, Welch R, Abe T, Hebert SC, Xu JZ. Rat homolog of sulfonylurea receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F659-666, 2000b.

Tapper AR, George AL Jr. MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J Gen Physiol* 116: 379-390, 2000.

Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature* 332: 837-839, 1988.

Tsai TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS. Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 268: C1173-1178, 1995.

Tsukada S, Simon MI, Witte ON, Katz A. Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11256-11260, 1994.

Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Paillard M, Planelles G, Dechaux M, Miller RT, Antignac C. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13: 2259-2266, 2002.

Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morrione A. The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol* 23: 3363-3372, 2003.

Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4440-4445, 1997.

Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 57: 1218-1223, 2000.

Wang T, Wang WH, Klein-Robbenhaar G, Giebisch G. Effects of a novel KATP channel blocker on renal tubule function and K channel activity. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 1382-1389, 1995.

- Wang WH, Giebisch G. Dual modulation of renal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by protein kinases A and C. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9722-9725, 1991.
- Wang WH, Cassola A, Giebisch G. Arachidonic acid inhibits the secretory K<sup>+</sup> channel of cortical collecting duct of rat kidney. *Am J Physiol* 262: F554-559, 1992.
- Wang WH. Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F14-19, 2006.
- Waters MG, Clary DO, Rothman JE. A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol* 118: 1015-10126, 1992.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13: 2031-2040, 1993.
- Wei Y, Bloom P, Gu R, Wang W. Protein-tyrosine phosphatase reduces the number of apical small conductance K<sup>+</sup> channels in the rat cortical collecting duct. *J Biol Chem* 275: 20502-20507, 2000.
- Wei Y, Bloom P, Lin D, Gu R, Wang WH. Effect of dietary K intake on apical small-conductance K channel in CCD: role of protein tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F206-212, 2001.
- Welling PA. Primary structure and functional expression of a cortical collecting duct K<sub>ir</sub> channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F825-836, 1997.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshv YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K<sup>+</sup> channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 273: 11745-11751, 1998.
- Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, Lifton RP. Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 680-684, 2003.
- Wojcik J, Girault JA, Labesse G, Chomilier J, Mornon JP, Callebaut I. Sequence analysis identifies a ras-associating (RA)-like domain in the N-termini of band 4.1/JEF domains and in the Grb7/10/14 adapter family. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 113-120, 1999.

Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395: 503-507, 1998.

Xia XM, Ding JP, Lingle CJ. Molecular basis for the inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci* 19: 5255-5264, 1999.

Xia XM, Ding JP, Zeng XH, Duan KL, Lingle CJ. Rectification and rapid activation at low  $\text{Ca}^{2+}$  of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J Neurosci* 20: 4890-4903, 2000.

Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am J Physiol* 273: F739-748, 1997.

Xu ZC, Yang Y, Hebert SC. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271: 9313-9319, 1996.

Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY, Blannar MA. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4017-4021, 1997.

Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, Welling PA. Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278: 23066-23075, 2003.

Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279: 6863-6873, 2004.

Yoo D, Fang L, Mason A, Kim BY, Welling PA. A phosphorylation-dependent export structure in ROMK (Kir 1.1) channel overrides an endoplasmic reticulum localization signal. *J Biol Chem* 280: 35281-35289, 2005.

Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G, Setiawan I, Boehmer C, Weinman EJ, Sandrasagra S, Korbmacher C, Cohen P, Pearce D, Lang F. The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary  $\text{K}^+$  channel ROMK1. *J Am Soc Nephrol* 13: 2823-2830, 2002.

Zeng WZ, Babich V, Ortega B, Quigley R, White SJ, Welling PA, Huang CL. Evidence for endocytosis of ROMK potassium channel via clathrin-coated vesicles. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F630-639, 2002.

Zeng WZ, Li XJ, Hilgemann DW, Huang CL. Protein kinase C inhibits ROMK1 channel activity via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278: 16852-16856, 2003.

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22: 537-548, 1999.

Zerangue N, Malan MJ, Fried SR, Dazin PF, Jan YN, Jan LY, Schwappach B. Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2431-2436, 2001.

Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. Activation of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by distinct PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> interactions. *Nat Cell Biol* 1: 183-188, 1999.

Zhou H, Chepilko S, Schutt W, Choe H, Palmer LG, Sackin H. Mutations in the pore region of ROMK enhance Ba<sup>2+</sup> block. *Am J Physiol* 271: C1949-1956, 1996.

## 7 Anhang

### 7.1 Vektoren

Tabelle 11: Vektoren

Bezeichnung	Größe	Selektionsmarker	Sequenzierprimer	Quelle / Zitat
pGBKT7	7,3 kb	Kan <sup>r</sup> / TRP1	T7, GAL4-BD-Seq-R GAL4-BD-ISA-F, GAL4-BD-ISA-R	Clontech
pGAD10	6,6 kb	Amp <sup>r</sup> / LEU2	GAL4-AD-Seq-F, GAL4-AD-Seq-R	Clontech
pGADT7	8,0 kb	Amp <sup>r</sup> / LEU2	T7, GAL4-AD-Seq-R GAL4-AD-ISA-F, GAL4-AD-ISA-R	Clontech
pACT2	8,1 kb	Amp <sup>r</sup> / LEU2	GAL4-AD-ISA-F, GAL4-AD-ISA-R	Clontech
pSGEM	3,1 kb	Amp <sup>r</sup>	T7, CL29	Hollmann et al., 1994
pcDNA3	5,4 kb	Amp <sup>r</sup> / Neo <sup>r</sup>	T7, SP6	Invitrogen
pcDNA3.1 Zeo(-)	5,0 kb	Amp <sup>r</sup> / Zeo <sup>r</sup>	pcDNA3.1-Seq-F, pcDNA3.1-Seq-R	Invitrogen
pCMV-HA	3,8 kb	Amp <sup>r</sup>	pCMV-HA-Seq-F	Invitrogen
pEGFP-C1	4,7 kb	Kan <sup>r</sup> / Neo <sup>r</sup>	-	Clontech
pCR-Blunt II-TOPO	3,5 kb	Kan <sup>r</sup> / Zeo <sup>r</sup>	M13F, M13R	Invitrogen

### 7.2 Genetische Konstrukte für die Expression in Hefe

Tabelle 12: Genetische Konstrukte für die Expression in Hefe

Expressionskonstrukte	Primer	Ausgangskonstrukte	Schnittstellen	Methoden
rROMK1(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7	rRomK-C-Not-F rRomK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	rROMK1-HA / pGEM, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK1(167-391)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK2 / pSGEM, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
EGFP-Leucinzipper / pGBKT7	Zur Verfügung gestellt von Blanche Schwappach, Universität Heidelberg			
hCDR62(147-332) / pGADT7	-	hCDR62(121-332) / pGAD10	SmaI / BglIII / BamHI	Verdau, Ligation
hROMK2(167-391, A198T)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(A198T) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-391, L220F)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(L220F) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-391, A306T)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(A306T) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation

Tabelle 12 (Fortsetzung): Genetische Konstrukte für die Expression in Hefe

Expressionskonstrukte	Primer	Ausgangskonstrukte	Schnittstellen	Methoden
hROMK2(167-391, R311W)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(R311W) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-391, Y314C)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(Y314C) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-391, L320P)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(L320P) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-391, R324L)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(R324L) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-391, F325C)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-C-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(F325C) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-362X)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-362X-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(WT) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hROMK2(167-368X)-Leucinzipper / pGBKT7	hROMK-C-Not-F hROMK-368X-Bam-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hROMK1(WT) / pEGFP-C1, Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / BamHI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hHCN2(468-889) / pGBKT7	hHCN2-Nde-F hHCN2-Bam-R	hHCN2 / pcDNA3.1 Zeo(+)	NdeI / BamHI	PCR, Verdau, Ligation
hHCN2(468-889)-Leucinzipper / pGBKT7	hHCN2-Not-F hHCN2-Sal-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hHCN2 / pcDNA3.1 Zeo(+), Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / SalI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hHCN4(519-1203) / pGBKT7	hHCN4-Nde-F hHCN4-Eco-R	hHCN4 / pcDNA3.1 Zeo(+)	NdeI / EcoRI	PCR, Verdau, Ligation
hHCN4(519-1203)-Leucinzipper / pGBKT7	hHCN4-Not-F hHCN4-Sal-R Zipper-Eco-F Zipper-Not-R	hHCN4 / pcDNA3.1 Zeo(+), Leucinzipper / pGBKT7	EcoRI / NotI / SalI	PCR, Verdau, 3-fach Ligation
hKCNE1(67-129) / pGADT7	hKCNE1-Nde-F hKCNE1-Eco-R	hKCNE1 / pcDNA3.1 Zeo(+)	NdeI / EcoRI	PCR, Verdau, Ligation
hKCNE2(73-123) / pGADT7	hKCNE2-Nde-F hKCNE2-Eco-R	hKCNE2 / pSGEM	NdeI / EcoRI	PCR, Verdau, Ligation
hKCNE3(81-103) / pGADT7	hKCNE3-Nde-F hKCNE3-Eco-R	hKCNE3 / pSGEM	NdeI / EcoRI	PCR, Verdau, Ligation
mKCNE4(59-170) / pGADT7	mKCNE4-Nde-F mKCNE4-Eco-R	hKCNE4 / pSGEM	NdeI / EcoRI	PCR, Verdau, Ligation

### 7.3 Genetische Konstrukte für die *in vitro* Synthese von cRNS

Tabelle 13: Genetische Konstrukte für die *in vitro* Synthese von cRNS

Expressionskonstrukte	Primer	Ausgangskonstrukte	Schnittstellen	Methoden
hGolgin-160-FLAG / pSGEM	-	hGolgin-160-FLAG / pSG5	EcoRI / EcoRI	Verdau, Ligation
hGM130 / pSGEM	GM130-F GM130-Xho-R	hGM130 / pcDNA3.1 myc-HisB	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hNRF2 / pSGEM	NRF2-outer-Xba-F NRF2-outer-Bam-R NRF2-inner-F NRF2-inner-R	RZPD Clone ID: IMAGp956J0617Q2 IMAGp998H0812037Q2	XbaI / BamHI	Overlap-PCR, Verdau, Ligation
hCDR62 / pSGEM	-	RZPD Clone ID IMAGp998D2410733Q2	NotI / EcoRI	Verdau, Ligation
hGRB7 / pSGEM	-	RZPD Clone ID IRALp962D232	EcoRI / XhoI	Verdau, Ligation
hGRB10 / pSGEM	GRB10-Bam-F GRB10-Eco-R	RZPD Clone ID IRAU969H0581D	BamHI / EcoRI	PCR, Verdau, 3-fach
hPP2A B56 $\beta$ / pSGEM	PP2AB-Elong-1F PP2AB-Elong-2F PP2AB-Elong-3F PP2AB-Elong-4F PP2AB-Elong-5F PP2AB-Elong-Hind-6F PP2AB-Elong-Xho-7R	PP2AB (28-497) / pACT2	HindIII / XhoI	5' Elongation über PCR, Verdau, Ligation
C13orf22 / pSGEM	-	RZPD Clone ID IRAKp961B2248	NotI / BamHI	Verdau, Ligation
TNRC5 / pSGEM	-	RZPD Clone ID IRALp962M0310	SacII / XhoI	Verdau, Ligation
hROMK2(A198T) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(A198T) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(L220F) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(L220F) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(A306T) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(A306T) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(R311W) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(R311W) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(Y314C) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(Y314C) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(L320P) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(L320P) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(R324L) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(R324L) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(F325C) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-Xho-R	hROMK1(F325C) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(362X) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-362X-Xho-R	hROMK1(WT) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation
hROMK2(368X) / pSGEM	hROMK-Eco-F hROMK-368X-Xho-R	hROMK1(WT) / pEGFP-C1	EcoRI / XhoI	PCR, Verdau, Ligation



Tabelle 13 (Fortsetzung): Genetische Konstrukte für die *in vitro* Synthese von cRNS

Expressionskonstrukte	Primer	Ausgangskonstrukte	Schnittstellen	Methoden
SGK1(WT) / pSGEM	-	SGK1WT / pCR-Blunt II-TOPO	EcoRI / ClaI	Verdau, Ligation
SGK1(S422D) / pSGEM	-	SGK1(S422D) / pCR-Blunt II-TOPO	EcoRI / ClaI	Verdau, Ligation
SGK1(T256A, S422D) / pSGEM	-	SGK1(T256A, S422D) / pCR-Blunt II-TOPO	EcoRI / ClaI	Verdau, Ligation
hROMK2 / pSGEM	Bereits vorhanden			
rROMK1-HA / pSGEM	Zur Verfügung gestellt von Blanche Schwappach, Universität Heidelberg			
hKir2.1 / pSGEM	Bereits vorhanden			
hKir2.1-PC / pSGEM	Zur Verfügung gestellt von Blanche Schwappach, Universität Heidelberg			
hKir2.2 / pSGEM	Zur Verfügung gestellt von Guiscard Seebom, Universität Tübingen			
hKir2.3 / pSGEM	Zur Verfügung gestellt von Guiscard Seebom, Universität Tübingen			
hKir2.4 / pSGEM	Zur Verfügung gestellt von Guiscard Seebom, Universität Tübingen			
hKv1.5 / pSGEM	Bereits vorhanden			
hKv4.3short / pSGEM	Bereits vorhanden			
HERG / pSGEM	Bereits vorhanden			
hGEB2 / pSGEM	Zur Verfügung gestellt von Guiscard Seebom, Universität Tübingen			

#### 7.4 Genetische Konstrukte für die Expression in Säugerzellen

Tabelle 14: Genetische Konstrukte für die Expression in Säugerzellen

Expressionskonstrukte	Primer	Ausgangskonstrukte	Schnittstellen	Methoden
hROMK1(167-391) / pCMV-HA	-	hROMK(167-391) / pGBKT7	SfiI / SalI	Verdau, Ligation
hGolgin-160-FLAG / pcDNA3.1 Zeo(-)	-	hGolgin-160-FLAG / pSG5	EcoRI / EcoRI	Verdau, Ligation
hROMK1(WT) / pEGFP-C1	Zur Verfügung gestellt von Siegfried Waldegger, Universität Marburg			
hROMK2 / pcDNA3	Bereits vorhanden			

## 7.5 Primer für die Klonierung

Tabelle 15: Primer für die Klonierung

Bezeichnung	Sequenz	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
rRomK-C-Not-F	ATAAGAATGCGGCCGCTGGAGTGATCATCAATTCCTTC	38	66
rRomK-C-Bam-R	CGGGATCCCTACATCTGGGTGTCGTC	28	68
hROMK-C-Not-F	ATAAGAATGCGGCCGCTGGAGTTATAATCAATTCCTTC	38	68
hROMK-C-Bam-R	CGGGATCCTTACATTTTGGTGTGTCATCTG	28	66
hROMK-Eco-F	CCGGAATTCGGGGAGTTATAATCAATTCCTTCAT	34	67
hROMK-Xho-R	CCGCTCGAGTTACATTTTGGTGTGTCATCTGT	30	66
Zipper-Eco-F	TGCATATGGCCATGGAGGCC	20	64
Zipper-Not-R	AGGCGCCTGTAGCTCGAAC	20	64
hROMK-Xho-R	CCGCTCGAGTTACATTTTGGTGTGTCATCTGT	30	67
hROMK-362X-Xho-R	CCGCTCGAGTTACTCATTATAAAGGCACATGGCAC	35	71
hROMK-368X-Xho-R	CCGCTCGAGTTACCTGGCTCTAACATCTTCTCATT	36	70
hROMK-362X-Bam-R	CGGGATCCTTACTCATTATAAAGGCACATGGCACAG	36	70
hROMK-368X-Bam-R	CGGGATCCTTACCTGGCTCTAACATCTTCTCATTATA	38	69
GM130-F	CACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGA	30	69
GM130-Xho-R	CCGCTCGAGTTAGATGACAGTGATCTTCAC	30	69
NRF2-outer-Xba-F	GCTCTAGACATGGATTTGATTGAC	24	61
NRF2-outer-Bam-R	CGGGATCCTCACATCACAGTAG	22	65
NRF2-inner-F	CAGAGCACTCACGTGCATGATG	22	65
NRF2-inner-R	CATCATGCACGTGAGTGCTCTG	22	65
PP2AB-Elong-1F	GTGCCCCACCCGACAAGGTGGACGGCTTCTCCCGC	36	81
PP2AB-Elong-2F	TCCCCGGGCTGTGCGCTGTGCCCCACCCGACAAG	36	82
PP2AB-Elong-3F	ACCCCACTAGCCCTCTCCCCGGGCTGTGCGCT	36	82
PP2AB-Elong-4F	AAGCTGCCCCCTGCAAGCACCCCACTAGCCCTCC	36	79
PP2AB-Elong-5F	CTGACCGCCATGGAGACGAAGCTGCCCCCTGCAAGC	36	78
PP2AB-Elong-Hind-6F	GAAAGCTTGCCCTGCCGCTGACCGCCATGGAGACG	36	78
PP2AB-Elong-Xho-7R	CCGCTCGAGGTGCTGTCTAGCTCTGACCCCACTGG	36	78
GRB10-Bam-F	CGGGATCCCTGGTGAACGATATGAATGCATCCCTG	35	76
GRB10-Eco-R	CGGAATTCAGCCGAGAGGACATCTGCGGTCATAAGG	36	76

Tabelle 15 (Fortsetzung): Primer für die Klonierung

Bezeichnung	Sequenz	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
hHCN2-Nde-F	GGAATTCATATGTCGCTGGACTCCTCGC	29	68
hHCN2-Bam-R	GCCCTAGGGCTCACAAGTTGGACGAGAGG	29	72
hHCN2-Not-F	TAAATGCCGCGGCCGCGTTCGCTGGACTCCTC	31	80
hHCN2-Sal-R	CGGTCCGGTTCGACTCACAAGTTGGACGAGAG	31	73
hHCN4-Nde-F	GGAATTCATATGTCCTGGACTCCTCCC	29	67
hHCN4-Eco-R	CGAATTCATAGATTGGATGGCAGTTTGGAG	30	65
hHCN4-Not-F	TAAATGCCGCGGCCGCGTCCCTGGACTCCTC	31	80
hHCN4-Sal-R	GGAAGGGTTCGACTCATAGATTGGATGGCAG	31	70
hKCNE1-Nde-F	GGAATTCATATGCGCTCCAAGAAGCTGG	29	68
hKCNE1-Eco-R	CGAATTCAGTGGTGGGGTTCATGGG	26	68
hKCNE2-Nde-F	GGAATTCATATGAAATCCAAGAGACGGG	29	64
hKCNE2-Eco-R	CGAATTCTGGTGCCTTCTCCCTTATCA	29	65
hKCNE3-Nde-F	GGAATTCATATGCGCTCCCGCAAAGT	27	68
hKCNE3-Eco-R	CGAATTCACCGTCCCAGCCCTCTC	25	68
mKCNE4-Nde-F	GGAATTCATATGAAATCCAAGAGGCGG	28	65
mKCNE4-Eco-R	CGAATTCCTAGGAGTTCTGGTGGATGTTCT	30	64

## 7.6 Primer für die Sequenzierung

Tabelle 16: Standardprimer für die Sequenzierung von Vektoren

Bezeichnung	Sequenz	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
T7	TAATACGACTCACTATAGGGC	21	60
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18	51
CL29	GCTTAGAGACTCCATTCG	18	45
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA GT	22	50
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	22	47
pcDNA3.1-Seq-F	ACTAGAGAACCCACTGCTTAC	21	61
pcDNA3.1-Seq-R	CAACTAGAAGGCACAGTCGAGG	22	65
pCMV-HA-Seq-F	GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC	27	56
GAL4-BD-ISA-F	TCATCGGAAGAGAGTAG	17	40
GAL4-BD-ISA-R	GTCAC TTAAAATTTGTATAC	21	40
GAL4-BD-Seq-R	TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT	24	58
GAL4-AD-ISA-F	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAAC	30	64
GAL4-AD-ISA-R	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT	32	62
GAL4-AD-Seq-F	TACCACTACAATGGATG	17	47
GAL4-AD-Seq-R	AGATGGTGCACGATGCACAG	20	62

Tabelle 17: Primer für die Sequenzierung von cDNS

Bezeichnung	Sequenz	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
hROMK-CTerm-Seq-F1	CTCTGGAGACTCAAGTGACCAT	22	63
hROMK-CTerm-Seq-F2	CAACTTTGTAGTTGACGCTGG	21	61
Golgin160-Seq-180F	GCTCTTGGCTGTTGCTGATGG	21	65
Golgin160- Seq-278F	CGCGTCGGCCGAGCAAGAT	19	67
Golgin160- Seq-769F	TGAAGCGCCAGCAGGAGAGGTC	22	68
Golgin160- Seq-1373F	AGCCGCTGAGCACCAAGACC	20	67
Golgin160- Seq-1709F	GGAGCGAGCCATGACTGACCTG	22	68
Golgin160- Seq-2243F	GATTCAGGAGGCAAAGACGATGGT	24	65
Golgin160- Seq-2848F	CCTCCAAAGACCAGCTCATCAGT	24	66
Golgin160- Seq-3452F	GGAAAAGGAACTGCAGGAGGTCAT	24	65
Golgin160- Seq-3878F	GCATAACCGCCGCGCCACTTCAA	21	65
Golgin160- Seq-4443F	CCCTGCCACGCCCATCAAGA	20	67
Golgin160- Seq-5047F	GGCCACCGATGCTGCTCTC	19	67
PP2AB-SeqR1	GCCACACAGTCCAAGAAGTC	20	62
PP2AB-SeqF2	TCCCACAGCTCCTCTCAGT	19	62
PP2AB-SeqF3	TCTTGGAGAGCCAGACTTC	20	62
PP2AB-SeqF4	ATGCCACTCTGACAGAGCAC	20	62
PP2AB-SeqF5	GTTTGATGAGCTCACAGCC	20	60
GRB7-Seq-1F	GCACACAACGTGGTCCGTT	19	60
GRB7-Seq-2F	ACAGCTCGCCACGTGTGT	18	62
GRB7-Seq-3F	CCTCTATTACTCCACCAAGGG	21	63
GRB7-Seq-4F	CTGAGTGTGGCCCTGGAG	18	64
GRB7-Seq-5F	ATCCTGCCGTGCTTGCT	17	60
GRB7-Seq-6R	ACTGCAGAGCTCAGGGAAG	19	62
GRB10-Seq-F	CAACATCTTCTCCCTGATCG	20	50
GRB10-Seq-R	GTCCTCTGCACAGAGCAAC	19	47
hHCN4-Seq-F	GGACCGCCTGGACCGCATTG	20	64
hHCN4-Seq-R	CACGGATCCTTGCTCCTGCC	20	59
hHCN2-Seq-F	GATGTACTTCATCCAGCACGGC	22	56
hHCN2-Seq-R	GCCGTGCTGGATGAAGTACATC	22	56

## 7.7 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	Kortikales Sammelrohr (engl.: Cortical Collecting Duct)
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Koloniebildende Einheiten
COS-7	Nierenzellen des <i>African Green Monkey</i>
cRNS	RNS, die aus cDNS durch <i>in vitro</i> Synthese erhalten wurde
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DC	Distales Konvolut (engl.: Distal Convolut)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Didesoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FD	Farad (Kapazität)
g	Gramm und Erdbeschleunigung
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
Hz	Hertz (Frequenz)
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Wirkkonzentration einer Substanz
Kir	Einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
Kv	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
l	Liter
LB	Luria Bertani-Medium
M	Molar
m	Meter
min	Minute
n	Anzahl
N-	Amino-
NAD(P)H	Nikotinamidadenin-dinukleotid(-phosphat)
Ω	Ohm (Widerstand)

P	Pore, Porendomäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDZ	PSD 95, Disk Large, ZO-1 (Proteindomäne)
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
$\rho$	Rho (Dichte)
RLU	Relative Lichteinheiten
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Zimmertemperatur
s	Sekunde
S	Siemens (Leitfähigkeit)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
T	Temperatur
TAL	Dicker aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife (engl.: Thick Ascending Limb)
TMD	Transmembrandomäne
U	Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
w/o	ohne (engl.: without)
w/v	Masse pro Volumen

#### Abkürzungen der Aminosäuren:

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

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Klaus Steinmeyer für die Bereitstellung des interessanten Themas und die exzellente fachliche Betreuung meiner Arbeit bedanken. Nur durch seine konstruktive Kritik, seine Anregungen und permanente Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren und folglich neue Ideen zu entwickeln, war die Anfertigung dieser Arbeit möglich. Darüber hinaus danke ich ihm für seine Freundschaft.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Andreas E. Busch für die Möglichkeit, in der Abteilung Herz-Kreislauf der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH eine Promotion durchführen zu können sowie seine Diskussionsbereitschaft und sein großes Interesse an meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann von der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau PD Dr. Blanche Schwappach sowie ihren Mitarbeiterinnen Dr. Ioana Neagoe, Jutta Metz und Katja Heusser vom Zentrum für Molekulare Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg danke ich für die angenehme Zeit in ihrem Labor sowie die produktive Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rolf Vajna, der mich mit seinen umfassenden biochemischen Kenntnissen auch bei schwierigen Fragestellungen unterstützt und damit wichtige Anregungen für die Arbeit geliefert hat. Aber auch für seinen Zuspruch in privaten Gesprächen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich sehr herzlich bei ihm bedanken.

Bei Florian Werner, Pia Kreuchau, Nicole Böhm und Inge Kress-Fischer möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima in unserem Labor bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an die Mitglieder der Abteilung Herz-Kreislauf, insbesondere Dr. Carsten Strübing, Dr. Thomas Licher, Dr. Thorsten Sadowski, Dr. Hella Schöttelndreier, Dr. André Markmann, Dr. Nico Flores-Herr, Dr. Sven Geibel, Dr. Paulus Wohlfart, Dr. Aimo Kannt, Dr. Sabine Roth, Susanne Voss, Stephan Müller, Andreas Hertler und Juliane Wiedemann. Meinen Praktikanten Graeme Baldwin, Dominik Paquet und Yvonne Holighaus möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihren Einsatz im Labor danken.

PD Dr. Guiscard Seebohm von der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und Dr. Niels Decher von der Philipps-Universität Marburg danke ich für die erfolgreiche Kollaboration. Für die Bereitstellung genetischer Konstrukte danke ich Dr. Yukio Ikehara und Dr. Yoshio Misumi von der *Fukuoka University School of Medicine*, Dr. Elon C. Roti Roti und Dr. Gail A. Robertson von der *University of Wisconsin-Madison* sowie Dr. Melanie Peters and PD Dr. Siegfried Waldegger von der Philipps-Universität Marburg.

Von ganzem Herzen danke ich Claudia Wagner, die durch ihre große Geduld und Hilfe ein wichtiger Rückhalt in den vergangenen Jahren für mich war.

## 9 Publikationsliste

### Originalveröffentlichungen

**Bundis F**, Neagoe I, Schwappach B, Steinmeyer K. Involvement of Golgin-160 in cell surface transport of renal ROMK channel: co-expression of Golgin-160 increases ROMK currents. *Cell Physiol Biochem* 17: 1-12, 2006.

Decher N, Pirard B, **Bundis F**, Peukert S, Baringhaus KH, Busch AE, Sanguinetti MC, Steinmeyer K. Molecular basis for block of open Kv1.5 channels: conservation of drug binding sites among K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 279: 394-400, 2003.

Decher N, **Bundis F**, Vajna R, Steinmeyer K. KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflugers Arch* 446: 633-640, 2003.

### Kongreßvortrag

**Bundis F**, Neagoe I, Schwappach B, Steinmeyer K. Involvement of Golgin-160 in cell surface expression of renal ROMK channel. *Acta Physiologica* 186 Supplement 1: 100, 2006. Joint Meeting of The German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, München, März 2006.



## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Florian Bundis  
Geburtsdatum/-ort 09.11.1972, Hamburg

### Schulbildung

1993 Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium in Hamburg (musischer Zweig)

### Zivildienst

09/1993-11/1994 Zivildienstleistender an einer Schule für geistig und körperlich behinderte Kinder der Evangelischen Stiftung Alsterdorf in Hamburg

### Studium

04/1995-02/2001 Studium der Biologie an der Universität Hamburg  
03/1998 Vordiplom in Physik, Chemie, Botanik und Zoologie mit der Gesamtnote „sehr gut“  
03/2000-02/2001 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Peter Fortnagel in der Abteilung Mikrobiologie der Universität Hamburg mit dem Thema „Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau chlorierter Xenobiotika“  
02/2001 Hauptdiplom in Mikrobiologie (Prof. Dr. P. Fortnagel), Molekularbiologie (Prof. Dr. E. Pratje) und Zoologie (Prof. Dr. L. Renwrantz) mit der Gesamtnote „sehr gut“

### Praktika

04/1998-03/1999 Projektarbeit am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg, Abteilung Mikrobiologie (PD. Dr. W. Sand)  
09/1998-10/1998 Praktikum am Hygiene Institut Hamburg, Abteilung Bakteriologie (Prof. Dr. J. Bockemühl)  
03/1999-04/1999 Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Abteilung Membranbiochemie (Prof. Dr. D. Oesterhelt)  
09/1999-12/1999 Projektarbeit am Zoologischen Institut der Universität Hamburg, Abteilung Patho- und Immunbiologie (Prof. Dr. L. Renwrantz)

### Promotion

09/2001-03/2005 Promotion bei Prof. Dr. Andreas E. Busch in der Abteilung Herz-Kreislauf der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von PD Dr. Klaus Steinmeyer mit dem Thema „Identifizierung und funktionelle Charakterisierung neuer Interaktionspartner des renalen ROMK-Kaliumkanals“  
11/2001-02/2002 Forschungsaufenthalt am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) bei PD Dr. Blanche Schwappach

### Postdoktorand

seit 05/2005 Postdoktorand am *Wellcome Laboratory for Molecular Pharmacology*, *University College London (UCL)* bei Dr. Martin Stocker

**11 Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

London, den 01.07.2006