

# **Die Rolle der 14-3-3-Proteine beim Vorwärtstransport von Kaliumkanälen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

Katja Heusser

2006

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

Zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von:

Katja Heusser  
aus Neustadt an der Weinstraße

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2006

**Thema:**

**Die Rolle der 14-3-3-Proteine beim  
Vorwärtstransport von Kaliumkanälen**

**Gutachter:**

**PD Dr. Blanche Schwappach  
Prof. Dr. Bernd Bukau**

Meinen Eltern



## Zusammenfassung

Kaliumkanäle, die wie andere Ionenkanäle und Membrantransportproteine ein wichtiges Bindeglied zwischen dem extrazellulären bzw. luminalen Raum und dem Zellinneren darstellen, spielen eine Rolle in diversen zellulären Prozessen wie Aufrechterhaltung des Membranpotentials, Frequenz und Verlauf von Aktionspotentialen, Sekretion und Signaltransduktion. Sie bilden temporär Poren in der Membran, durch die hochselektiv Kaliumionen entlang eines elektrochemischen Gradienten transportiert werden können. Ihre Einbindung in zahlreiche physiologische Prozesse impliziert ihre strikte Regulation auf mehreren Ebenen, angefangen bei der Gewebe-spezifischen Expression über die Kontrolle der Kopienzahl am Ort ihrer Aktivität, bis hin zu den Regulationsmechanismen der Öffnungswahrscheinlichkeit der Pore und der Ionenselektivität. Ein funktioneller Kaliumkanal wird durch die Zusammenlagerung von homomeren oder heteromeren Untereinheiten gebildet, wobei bis zu vier primäre oder  $\alpha$ -Untereinheiten den Kanal bilden und mit weiteren akzessorischen bzw.  $\beta$ -Untereinheiten assemblieren können. Für die Funktionalität von pankreatischen ATP-sensitiven Kaliumkanälen ist eine stöchiometrisch korrekte Assemblierung der beiden Untereinheiten Kir6.2 und SUR1 essentiell. Vier Kanal-bildende Untereinheiten Kir6.2 müssen sich mit vier regulatorischen SUR1-Untereinheiten zu einem Oktamer zusammenlagern, damit der am Prozess der Insulinsekretion beteiligte Kaliumkanal zur Plasmamembran transportiert werden kann. Die Regulation auf der Ebene der Assemblierung erfolgt durch die Anwesenheit von ER-Lokalisationssignalen in den zytosolischen Domänen beider Proteinuntereinheiten. Diese Arginin-haltigen Motive (RKR) werden von zwei gegensätzlich wirkenden Interaktionspartnern erkannt: Einzelne bzw. unvollständig oder falsch zusammengelagerte Untereinheiten werden durch die COPI-Maschinerie zum ER zurückgeführt, während zytosolische 14-3-3-Proteine am Vorwärtstranport zur Plasmamembran beteiligt sind. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 14-3-3-Proteine nicht nur spezifisch Kir6.2-Reporterproteine binden können, sondern dass diese Proteine am Transport des vollständigen, heterooktameren  $K_{ATP}$ -Kanalkomplexes beteiligt sind. Die Interaktion ist dabei eng an den Multimerisierungsstatus gekoppelt und involviert Aminosäurebereiche außerhalb der ER-Lokalisationssequenz in Kir6.2. Dabei ist die Aufgabe der 14-3-3-Proteine letztlich die Inaktivierung der Arginin-Signale in der Untereinheit SUR1, denn die Signale von Kir6.2 werden durch die korrekte Assemblierung mit SUR1 maskiert. Die 14-3-3-Proteine dienen dabei ausschließlich der Qualitätskontrolle und spielen keine Rolle beim Vorwärtstransport *per se*, denn sie haben keinen Einfluss auf den Transport des Kanals zur Zelloberfläche, wenn alle acht ER-Lokalisationssignale im  $K_{ATP}$ -Komplex mutiert sind.

Die Untersuchung eines Kir6.2-Reporterproteins in Bäckerhefezellen, in denen jeweils nur eine von den insgesamt sieben Säuger-14-3-3-Isoformen exprimiert wird, deuten auf eine 14-3-3-Isoform-Spezifität beim Vorwärtstransport von Membranproteinen hin. So ist denkbar, dass verschiedene 14-3-3-Isoformen den Transport pankreatischer  $K_{ATP}$ -Kanäle in verschiedene Kompartimente regulieren, da diese offensichtlich hauptsächlich in Insulin-enthaltenden sekretorischen Vesikeln und nur in geringer Kopienzahl an der Plasmamembran präsent sind. Eine vergleichbare Aufgabe in der Qualitätskontrolle nehmen 14-3-3-Proteine bei den Zwei-Poren-Kaliumkanälen TASK1 und TASK3 ein. Hier erkennen 14-3-3-Proteine ein neu entdecktes Arginin-haltiges ER-Lokalisationssignal im C-Terminus der Kanalproteine und sind wie bei  $K_{ATP}$ -Kanälen für die Inaktivierung dieses Signals verantwortlich, woraufhin die Kanäle an die Plasmamembran transportiert werden können.

## Abstract

Potassium channels connect inside and outside of a cell like other ion channels or membrane transport proteins. Potassium channels play a role in diverse processes like stabilizing the membrane potential, frequency and duration of action potentials, secretion and signal transduction. Through temporally open pores in the lipid bilayer potassium ions are conducted with high selectivity along the electrochemical gradient. Their involvement in physiologically important processes implicates strict regulation like tissues-specific expression, copy number in membranes, open probability and ion selectivity. Functional potassium channels are formed by assembly of two to four  $\alpha$ -subunits which can further coassemble with  $\beta$ -subunits. Heterologous expression of Kir6.2 in pancreatic  $\beta$ -cells alone does not result in functional channel activity of ATP-sensitive Potassium channels involved in insulin secretion. Each of these proteins requires an additional SUR1 subunit, which coassembles with Kir6.2 in a 4:4 stoichiometry to form an octameric channel complex. This is regulated by Arginine-based ER localisation signals present in the cytosolic domains of both channel subunits. These signals are recognized by either COPI components or 14-3-3 proteins, returning incorrectly assembled complexes and single subunits back to the ER, promoting forward transport of correctly assembled channel complexes respectively. This work provides evidence for the involvement of 14-3-3s not only in the forward transport of Kir6.2 reporter proteins but in the transport of the whole  $K_{ATP}$  channel complex to the cell surface. Interaction strictly depends on multimerization of the subunits and on aminoacid residues beside the RKR sequence of Kir6.2 protein. The Arg-based signal present in Kir6.2 is sterically masked by the SUR1 subunit. In contrast, 14-3-3 proteins functionally antagonize the Arg-based signal present in SUR1. They do not appear to have a positive effect on forward trafficking *per se*, because they have no effect on surface expression when all eight of the Arg-based ER localization signals present in  $K_{ATP}$ -complex are mutated. Trafficking studies of a multimeric Kir6.2 yeast reporter in yeast strains of different genetic backgrounds (only one of seven mammalian 14-3-3 isoforms expressed) point towards isoform specificity of the role of 14-3-3s in membrane protein trafficking. Different 14-3-3 isoforms could regulate forward transport of  $K_{ATP}$  into different compartments since the secretory granule membrane is the major site of  $K_{ATP}$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells and only a few copies reside on the plasma membrane. 14-3-3 proteins do also count for the forward transport of other proteins like K2P channels TASK1 and TASK3. Here they seem to inactivate a recently identified ER localisation signal present in the distal C-terminal tail of the two pore potassium channels.

## Abkürzungen

A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COPI bzw. COPII	Coatomer Proteine I bzw. II
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
etc.	<i>et cetera</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales Rinderserumalbumin
g	Gramm
h	Stunde
HIV	Humaner Immunodefizienz Virus
IgG	Immunglobulin Typ G
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas, außerhalb des Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Objekt
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilo-Base, tausend Basen
kDa	Kilo-Dalton, tausend Dalton
l + L	Liter
LB	Luria-Bertani
LTR	Long Terminal Repeat
m	milli
M	molar
MCAT-1	Maus Kationen-Aminosäuretransporter
Min	Minute (n)

mRNA	Boten-RNA
μ	mikro
nm	Nanometer (Wellenlänge)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
s + S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1-24</b>
1.1	Intrazelluläre Transportwege	1-6
1.1.1	Der Vesikel-Transport	1-4
1.1.2	Sortierungssignale für COPI- und COPII-Vesikel	4-5
1.1.2.1	Einflussfaktoren auf die Wirkung von Sortierungssignalen	5-6
1.2	Transport zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum	6-9
1.2.1	Membrantransportproteine	8-9
1.3	Ionenkanäle	10-16
1.3.1	Kaliumkanäle	12-16
1.3.1.1	KCNK-Kanäle	13-15
1.3.1.2	Kir-Kanäle, die Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle	15-16
1.4	K <sub>ATP</sub> -Kanäle	16-21
1.4.1	Polymorphismen im K <sub>ATP</sub> -Kanal und Diabetes	20-21
1.5	14-3-3-Proteine beim Vorwärtstransport von Membranproteinen	22-24
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25-80</b>
2.1	Die Kompartimentierung der Untereinheiten von K <sub>ATP</sub> -Kanälen	25-39
2.1.1	Subzelluläre Verteilung der K <sub>ATP</sub> -Kanal-Untereinheiten SUR1 und Kir6.2 in der $\beta$ -Zelllinie INS-1	26-27
2.1.2	Mechanismus der Interferenz-RNA und Design von shRNA-Sequenzen	27-29
2.1.2.1	Reduktion der Expression von Kir6.2 und SUR1 durch siRNA in COS-1-Zellen	29-31
2.1.3	Herstellung stabiler RNAi-Zelllinien	31
2.1.3.1	Stabile Integration von Kir6.2 shRNA Nr.1684 in $\beta$ -Zellen	31-33
2.1.3.2	Stabil integrierte shRNA reduziert die Expression von Kir6.2 in $\beta$ -Zellen	32-34
2.1.3.3	Immunfluoreszenz der stabilen Zelllinien INS-1-6.2-1684 und INS-1-U6	32-34
2.1.3.4	Stabile Integration von SUR1 shRNA Nr.2918 in $\beta$ -Zellen	34-36
2.1.3.5	Immunfluoreszenz der stabilen Zelllinien INS-1-SUR1-2918 und INS-1-U6	35-36
2.1.3.6	Kultivierung der transduzierten $\beta$ -Zelllinien über einen längeren Zeitraum	37
2.1.3.7	Analyse von homogenen Zellpopulationen transduzierter INS-1-Zellen mit verschieden starker Expression des Reporterproteins GFP	37-39
2.2	Die Rolle der 14-3-3-Proteine beim Transport der K <sub>ATP</sub> -Kanäle an die Zelloberfläche	40-65
2.2.1	Oberflächenexpression von K <sub>ATP</sub> -Kanälen nach Manipulation zellulärer 14-3-3-Levels	41-47
2.2.1.1	Wirkung eines 14-3-3-Scavengers in <i>Xenopus</i> Oocyten und Säugerzellen	41-44
2.2.1.2	Einfluss von Säuger 14-3-3-Isoformen auf die Expression eines Reporters in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45-47
2.2.3	Oberflächenexpression und Interaktionsverhalten von mutierten K <sub>ATP</sub> -Kanälen und Reporterproteinen	48-65
2.2.3.1	Oberflächenverhalten von Kir6.2-Reporterproteinen mit verkürzten C-Termini	48-52
2.2.3.2	Immunpräzipitation von multimeren Kir6.2-Reportern mit verkürzten C-Termini	53-54
2.2.3.3	Bindungsexperimente mit tetrameren Kir6.2-Affinitätskonstrukten	55-57
2.2.3.4	Oberflächenverhalten von tetrameren Kir6.2-Reporterproteinen mit C-terminalen Mutationen	57-58
2.2.3.5	Immunfluoreszenzfärbung von CD4pLI-RKR- und CD4pLI-RKRDC10-Reporterproteinen	59-62
2.2.4	Oberflächenexpression von K <sub>ATP</sub> -Fusionsproteinen	63-65
2.2.4.1	Einfluss von Verkürzung des Kir6.2-Carboxyterminus auf K <sub>ATP</sub> -Kanäle	63-65
2.2.4.2	Wirkung eines 14-3-3-Scavengerproteins auf die Oberflächenexpression von K <sub>ATP</sub> -Kanälen	64-65
2.3	Multiple Motive im Kir6.2 C-Terminus	66-71
2.3.1	Einfluss des LL-Signals auf die Oberflächenpräsenz von Kir6.2-Reporterproteinen	67-69
2.3.2	Einfluss des Guanin-Nukleotidaustauschers mSec7-1 auf den Oberflächentransport von Kir6.2-Reporterproteinen und GABA <sub>B</sub> R1-Varianten	69-71

2.4	Sortierungssignale und Vorwärtstransport von K <sub>2</sub> P-Kanälen	73-80
2.4.1	Einfluss von C-terminalen Deletionen und Trunkationen auf die Oberflächenexpression von CD8TASK1	73-76
2.4.2	Einfluss von C-terminalen Mutationen und Trunkationen auf die Oberflächenexpression von CD8TASK3	76-78
2.4.3	Wirkung eines N-terminalen KR-Motivs von TASK (1)-Proteinen auf lip35	78-80
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81-109</b>
3.1	Subzelluläre Kompartimentierung von K <sub>ATP</sub> -Untereinheiten	81-86
3.1.1	RNAi reduziert Expression von K <sub>ATP</sub> -Untereinheiten in COS-1-Zellen	82
3.1.2	Wirkungsweise von konstitutiv exprimierter RNAi in $\beta$ -Zelllinien	83-84
3.1.2.1	Langzeiteffekte in den RNAi- $\beta$ -Zelllinien	84-86
3.2	14-3-3-Proteine und K <sub>ATP</sub> -Untereinheiten	86-100
3.2.1	Reduktion endogener 14-3-3-Proteine stört den Vorwärtstransport von K <sub>ATP</sub> -Kanälen	86
3.2.2	Zusätzliche 14-3-3-Rekrutierung verstärkt den Vorwärtstransport von Kir6.2-Reporterproteinen	87-88
3.2.3	Säuger-14-3-3-Proteine komplementieren den Vorwärtstransportdefekt in Hefezellen ohne 14-3-3-Proteine	88-89
3.2.4	Aminosäuren im distalen Kir6.2-C-Terminus beeinflussen den Vorwärtstransport von multimeren Reporterproteinen	90-97
3.2.4.1	Trunkationen im Kir6.2-C-Terminus beeinträchtigen die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen	91-93
3.2.4.2	Mutationen im distalen Kir6.2-C-Terminus verändern Vorwärtstransport von multimeren Reportern in geringem Maße	93-94
3.2.4.3	Verkürztes Kir6.2-Reporterprotein lokalisiert in filamentären ER-Strukturen	94-96
3.2.5	C-terminale Trunkation der K <sub>ATP</sub> -Kanal-Untereinheit Kir6.2 beeinträchtigt die Maskierung des Arginin-Signals in der K <sub>ATP</sub> -Kanal-Untereinheit SUR1	96-97
3.2.6	Reduktion endogener 14-3-3-Proteine beeinträchtigt die Maskierung des Arginin-Signals in SUR1	97-98
3.2.7	Modell der funktionelle Inaktivierung der acht ER-Lokalisationssignale im K <sub>ATP</sub> -Kanal-Komplex	99-100
3.3	Einfluss eines Dileucin-Signals auf den Vorwärtstransport von Kir6.2-Reporterproteinen	100-103
3.3.1	Einfluss des GEF mSec7-1 auf die Oberflächenexpression von LL-tragenden Membran- (Reporter-) Proteinen	103-105
3.4	Mehrere ER-Lokalisationssignale kontrollieren den Vorwärtstransport von K <sub>2</sub> P-Kaliumkanälen	105-109
	<b>Ausblick</b>	<b>110</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>111-134</b>
<b>4.1</b>	<b>Material</b>	<b>111-122</b>
4.1.1	Standardmedien, -Puffer und -Lösungen	111-115
4.1.2	Enzyme	116
4.1.3	Kits und andere Reagenzien	116
4.1.4	Geräte	116
4.1.5	Antikörper	117
4.1.6	Bakterienstämme	117
4.1.7	Hefestämme	117
4.1.8	Säugerzelllinien	118
4.1.9	Oligonukleotide	118-120
4.1.9.1	siRNA Oligonukleotide	118
4.1.9.2	Oligonukleotide für Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	119
4.1.10	Expressionsplasmide	120-122
4.1.10.1	Säugerexpressionsplasmide	120-121

4.1.10.2	Hefeexpressionsplasmide	121
4.1.10.3	Bakterienexpressionsplasmide	121
4.1.10.4	Virale Expressionsplasmide	122
4.1.10.4.1	Lentivirale Expressionsplasmide und Helferplasmide	122
4.1.10.4.2	Andere Retrovirale Expressionsplasmide und Helferplasmide	122
<b>4.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>123-134</b>
4.2.1	Allgemeine DNA-Techniken und Klonierungen	123-125
4.2.1.1	Restriktionsverdau von DNA-Molekülen	123
4.2.1.2	Auftrennung von DNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese	123
4.2.1.3	Aufreinigung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen	123
4.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	123-124
4.2.1.5	Hybridisierung von Einzelstrang-Oligonukleotiden	124
4.2.1.6	Ligation von DNA-Molekülen	124-125
4.2.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	125
4.2.1.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	125
4.2.2	Allgemeine Proteintechniken	125-127
4.2.2.1	SDS-PAGE	125-126
4.2.2.2	Coomassie Brilliant Blau-Färbung	126
4.2.2.3	Western Blot Detektion	126-127
4.2.2.4	Messung von Proteinkonzentrationen	127
4.2.3	Transformation von Bakterienzellen - Elektroporation	127
4.2.3.1	Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen	127
4.2.4	Transformation von Hefezellen	127-128
4.2.5	Transfektion in Säugerzellen	128-129
4.2.5.1	Transiente Transfektion (Lipofektion)	128
4.2.5.2	Retroviraler Gentransfer	128-129
4.2.6	Allgemeine Techniken der Säugerzellkultur	129-130
4.2.6.1	Passagieren und Einfrieren von Säugerzellen	129
4.2.6.2	Auftauen von Säugerzellen	129-130
4.2.7	Präparieren von Säugerzellen für FACS-Analyse bzw. -Sortierung	130
4.2.8	Proteinassays in Säugerzellen	130-132
4.2.8.1	Zelllyse zur Extraktion von Proteinen	130
4.2.8.2	Immunpräzipitation	130-131
4.2.8.3	Chemilumineszenter Nachweis von Zelloberflächenproteinen	131
4.2.8.4	Immunfluoreszenzfärbung von Säugerzellen	131-132
4.2.8.5	Subzelluläre Fraktionierung von Säugerproteinen	132
4.2.9	Proteinexpression und Proteinaufreinigung in Bakterien	132-134
4.2.9.1	Proteinexpression	133
4.2.9.2	Proteinaufreinigung	133
4.2.10	Bindungsexperiment mit in Bakterien exprimierten Proteinen	133-134
	<b>Anhang</b>	<b>135</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>136-149</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Intrazelluläre Transportwege

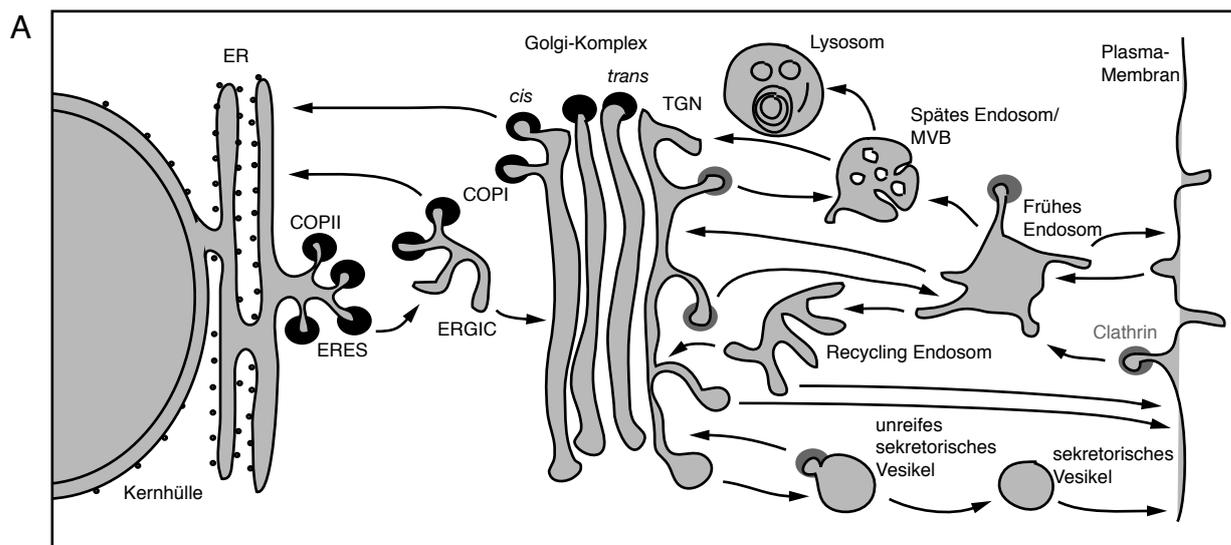
### 1.1.1 Der Vesikel-Transport

Die eukaryotische Zelle wird von einer Plasmamembran umgeben, die den Transport von Stoffen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung regelt. Durch interne Membranen wird die Zelle in verschiedene Kompartimente aufgeteilt. Voneinander abgegrenzte und mit einer spezifischen Aufgabe betraute Kompartimente – die Organellen – sind von einer Phospholipiddoppelschicht umgeben, welche auch die Plasmamembran bildet und, je nach Funktionsbereich, ein bestimmtes Set an weiteren Lipiden aufweist. Das hauptsächliche Charakteristikum einer biologischen Membran bilden jedoch spezifische Proteine, die peripher assoziiert oder in die Membranstruktur integriert sind. Die Membranen der meisten Organellen und der Zelloberfläche sind über ein inneres Membransystem oder über Vesikel miteinander verbunden (Palade, 1975). Diese sogenannte Vesikel-Transport-Hypothese besagt, dass der Transfer von Proteinen zwischen den Organellen des sekretorischen Weges über mobile Transportvesikel gewährleistet wird. Dabei lösen sich Membran-umhüllte Vesikel unter Einschluss des für den Transport ausgewählten Moleküls von einem „Donor-Kompartiment“, werden zum „Akzeptor-Kompartiment“ transportiert und fusionieren mit den dort ansässigen Membranen, wobei das Transportmolekül freigesetzt wird. Zytoplasmatische „Mantel“-Proteine umhüllen die Vesikel, wobei ein unterschiedliches Set von „Mänteln“ für unterschiedliche Transportereignisse zuständig ist (Lee und Miller, 2004) (Abbildung 1(A)).

Neben Lipiden und Kohlenhydraten werden Proteine, die an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden – dazu gehören sowohl Sekretproteine, Enzyme des ER, des Golgi-Apparates und der Lysosomen, als auch integrale Membranproteine der Plasmamembran – über diesen sekretorischen Weg an ihre Zielorte gebracht. Die korrekte Ausführung der Proteinsortierung ist entscheidend für die Funktion und Organisation der Zelle. Im sekretorischen Weg sind Synthese und Sortierung der Proteine eng miteinander gekoppelt, mehrerer spezialisierte Zellorganellen kooperieren bei der Modifikation der Proteine bis zu ihrer vollständigen Reife: Das neusynthetisierte Polypeptid gelangt über den Translocon-Komplex (Görlich und Rapoport, 1993) ins Lumen des ER, wo es mit Hilfe von Chaperonen seine korrekte Konformation einnimmt und (im Falle eines multimeren Proteins) mit anderen Polypeptid-Untereinheiten assembliert. Nach posttranslationalen Modifikationen wie z.B. die Anheftung von Glykanen an Asparagin-Reste gelangen das Protein an sogenannte ER-Exit-

Stellen (ERES), Regionen im ER, die COPII-Vesikel ausbilden können (Pagano et al, 1999). Die Hülle des Coatomer-Protein-Komplex II (COPII) wird von drei Proteinen gebildet, der kleinen GTPase Sar1 und den zwei großen heteromeren Proteinkomplexen Sec23-Sec24 und Sec13-Sec31. Die Bildung der COPII-Vesikel und die Auswahl bzw. der Einschluss des für den anterograden (biosynthetischen) Transport bestimmten Proteins, können dabei als koordinierter Prozess angesehen werden (Barlowe, 2003). COPII-Vesikel transportieren Proteinmoleküle vom ER zum ER-Intermediat-Kompartiment (ERGIC oder vesikulär-tubuläres Cluster (VTC)) oder zum Golgi-Apparat. Proteine, die für die Sekretion oder die Integration in die Plasmamembran vorgesehen sind, passieren den Golgi-Apparat, eine Serie von Zisternen mit hauseigenen Enzymen, die für die Modifikation der Glykan-Seitenkette und die proteolytische Spaltung zuständig sind. Die Modifikation durch Glykosyltransferasen schreitet sequentiell von *cis*- über medial- zu *trans*-Golgi-Zisternen voran. Das *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) stellt eine Sortierstation dar, die Proteine entweder zur Zelloberfläche sendet oder sie in andere Kompartimente des Endomembransystems wie z.B. Lysosomen oder Vakuole dirigiert (Lee, und Miller, 2004). Bestimmte Sekretproteine und die meisten Membranproteine gelangen in Transportvesikel, die kontinuierlich mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt durch Exozytose freisetzen. Manche Sekretproteine – wie Insulin in pankreatischen  $\beta$ -Zellen – werden (nach Aggregatbildung) intrazellulär in bestimmten sekretorischen Vesikeln gespeichert und erst nach Stimulation durch Exozytose freigesetzt. Bei den meisten Sekretproteinen sowie bei einigen Membranproteinen der Zelloberfläche erfolgt der letzte Schritt der Proteinreifung in den Transportvesikeln, die sich vom TGN abschnüren. Hier sind Endoproteasen und Carboxypeptidasen aktiv, sie wandeln die Pro-Proteine (Vorläuferproteine) durch proteolytische Spaltung in die reifen Proteine um.

Um diesen Vorwärtstransport von Proteinmolekülen auszubalancieren, müssen Komponenten der Transport-Maschinerie und andere „flüchtige“ Proteine wieder zum ursprünglichen „Donor“-Kompartiment zurückgebracht werden. COPI-Vesikel stellen solche Transportvesikel dar, die zum einen den bidirektionalen Transport innerhalb der Golgi-Zisternen vermitteln, zum anderen den retrograden Transport bzw. den Recyclingtransport vom Golgi-Apparat zurück zum ER (Rabouille und Klumperman, 2005). Die Mantel-bildenden Proteine dieser Transportvesikel sind die kleine GTPase ARF1 und verschiedenen Coatomer-Proteinuntereinheiten, die sich zu einem heptameren Komplex zusammenlagern (Rothman und Wieland, 1996). Ein initiatorisches Ereignis für die Assemblierung von COPI-Vesikeln scheint die Interaktion von GTP-gebundenem ARF1 mit dem Membranprotein p23 zu sein. Wird GTP hydrolysiert, dissoziiert



B

ER-Export	VSV-G	Vesikular-Stomatitisvirus Protein G	YTDIE
	Kir2.1	Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 2.1	FCYENE
	Kir1.1	Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 1.1	VLSEVDET D
	ERGIC-53	ER-Golgi-Intermediat-Kompartiment Protein 53	FF
	Sed5p	Golgi-t-Snare	LMLME
ER-Lokalisation	Kir6.2	Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 6.2	LRKR
	Kir6.1	Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 6.1	LRKR
	SUR1	Sulfonylharnstoffrezeptor 1	NRKR
	GABA <sub>B</sub> R1	γ-Aminobuttersäure-Rezeptor Untereinheit 1	LRSR
	lip35	Invariante Kette 35 des MH-Komplexes II	RRRS
	Wbp1	Hefemembranprotein	KKXX
	p23	Säugermembranprotein der p24 Familie	KKXXX

**Abbildung 1: Intrazelluläre Transportwege und Sortiersignale.** (A) Schematische Darstellung des sekretorischen-, lysosomal-/vakuolären- und endozytotischen Weges in einer eukaryotischen Zelle (nach Bonifacino und Glick, 2004). Die einzelnen Transportschritte sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die dunklen Kreise kennzeichnen die (z.T. noch nicht gesicherte) Lokalisation von COPI-, COPII- und Clathrin-Vesikeln, wobei farblich nur zwischen COPI/COPII oder Clathrin unterschieden wird (schwarz bzw. dunkelgrau). Es existieren weitere hier nicht dargestellte Vesikel-Hüllen oder Hüllen-ähnliche Komplexe. Die Funktion von COPII-Vesikeln beim ER-Export sowie von Clathrin-umhüllten Vesikeln an der Plasmamembran bei der Endozytose ist gesichert, weniger gut charakterisiert ist die exakte Funktion von COPI im ER-Intermediat-Kompartiment (ERGIC) und Golgi-Komplex, sowie die Rolle von Clathrin im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), den frühen Endosomen und unreifen sekretorischen Vesikeln. MVB = Multivesicular Body. (B) Beispiele von Proteinen mit identifizierten Sortiersignalen, die den Export aus dem ER (oben) bzw. die ER-Lokalisation (unten) bewirken.

p23 von ARF1 und es entstehen zwei Bindestellen für den Coatomer-Mantel, nämlich eine an ARF-GTP und eine an p23 (Gommel et al, 2001).

Neben COPI- und COPII-Vesikeln vermitteln andere Vesikel mit einem Mantel aus Strukturproteinen den Transport von Proteinen von der Plasmamembran zu den Endosomen (Rezeptor-vermittelte Endozytose), vom TGN zu den Endosomen oder von frühen Endosomen zu späten Endosomen. Diese Clathrin-umhüllten Vesikel weisen einen Mantel aus drei leichten und drei schweren Clathrin-Ketten und heterotetrameren Adaptor-Protein-(AP)Komplexen auf. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen Clathrin-AP1, Clathrin-AP2 und Clathrin-GGAs (Golgi-assoziierte- $\gamma$ -Adaptin-Ohr-enthaltende-ARF-bindende Proteine). Wie auch bei den schon zuvor beschriebenen ummantelten Vesikeln bestimmen hier (außer bei AP-2) GTP-bindende Proteine die Bildung oder Auflösung der Mantelstrukturen. Weitere Vesikel mit einer Hülle aus Adaptorproteinkomplexen (AP3 und AP4) aber ohne Clathrin vermitteln den Transport vom TGN zu den Endosomen und ihre Membran-Rekrutierung wird über die GTPase ARF1 reguliert. Vier der Untereinheiten der COPI-Vesikel sowie die vier Untereinheiten von AP3 und AP4 sind den Untereinheiten von AP1 und AP2 homolog, keine strukturellen Ähnlichkeiten bestehen jedoch zwischen den Untereinheiten des COPII-Komplexes und den anderen aufgelisteten Mantelbildenden Strukturen. Während die Rekrutierung von AP1, AP3, AP4 und COPI an die Membranen von der GTPase ARF1 reguliert wird, hat bei COPII-Vesikeln Sar1, ein ARF1-verwandtes Protein, den Regulationsentscheid (Bonifacino und Lippincott-Schwartz, 2003).

### 1.1.2 Sortierungssignale für COPI- und COPII-Vesikel

Neben ihrer Rolle bei der Ausbildung von Transportvesikeln sind die Mantel-bildenden Proteine für das selektive „Einfangen“ der zu transportierenden Proteinmoleküle verantwortlich. Diese Interaktion basiert auf der Erkennung spezifischer Signale in den zytoplasmatischen Domänen der Transportmoleküle. Im Folgenden werden Beispiele für Sortierungs-Signale aufgeführt, die von den Vesikeln der ersten Stationen des sekretorischen Weges, COPI und COPII, erkannt werden (Abbildung 1(B)).

Die direkte Interaktion zwischen einem Sortiersignal und Transportvesikeln wurde ausführlich für das di-basische KKXX-ER-Rückführungs-(retrieval) Signal und COPI beschrieben (Cosson und Letourneur, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass di-basische Arginin-(RXR)Signale in einzelnen Untereinheiten von oligomeren Oberflächenrezeptoren und Kanälen als ER-Lokalisationssignal wirken und Komponenten von COPI-Vesikeln binden können (Margeta-Mitrovic, 2000; O'Kelly et al, 2002; Raja et al, 2002; Yuan et al, 2003). Weder für

KKXX- noch für Arginin-haltige ER-Lokalisationssignale konnten die molekularen Details der COPI-Interaktion bisher befriedigend geklärt werden (Lee et al, 2004). So übersichtlich die Erkennungssignale für COPI-Vesikel erscheinen, so vielfältig sind die ER-Export-Signale, die von COPII registriert werden. Während lösliche sekretorische Proteine nicht direkt von Coatomer-Untereinheiten gebunden werden können, sind für einige Transmembranproteine verschiedene di-acide (z.B. „FCYENE“ in Kir2.1) und di-hydrophobe (z.B. „FF“ in ERGIC-53) Signale gefunden worden, die spezifisch an COPII binden (Abbildung 1(B)) (Bonifacino und Glick, 2004). Diese ER-Export-Signale werden spezifisch von den Sec24-Proteinen, wobei Sec24 multiple Erkennungsstellen aufweist und möglicherweise Unterstützung von der GTPase Sar1 erhält (Giraudo und Maccioni, 2003).

#### **1.1.2.1 Einflussfaktoren auf die Wirkung von Sortierungssignalen**

Um von der Coatomer-Maschinerie erkannt zu werden, müssen die soeben besprochenen Signale zugänglich sein und eine bestimmte Konformation aufweisen. Die Interaktion mit Transportrezeptoren oder akzessorischen Proteinen kann dabei ebenso Einfluss ausüben wie die Oligomerisierung.

Da weder lösliche Transportproteine noch Membranproteine mit Glykosylphosphatidylinosit (GPI)-Anker zytoplasmatische Signale für die Interaktion mit Transportvesikeln vorweisen, müssen spezielle Transmembranrezeptoren zwischen Cargo und Vesikel vermitteln. So kann das Lectin ERGIC-53 über das Signal „FF“ an COPII binden und einigen Sekretproteinen dadurch zum Vorwärtstransport verhelfen (Lee et al, 2004). Lösliche Proteine des ER exprimieren das spezielle Rückführungssignal „KDEL“, welches vom KDEL-Rezeptor erkannt wird. Über das Di-Lysin-Signal des Rezeptors kommt die Verbindung zu COPI-Vesikeln zustande. Möglicherweise induziert der Ligand die Oligomerisierung des KDEL-Rezeptors, was wiederum die Interaktion mit dem Mantel der COPI-Vesikel stimuliert (Majoul et al, 2001).

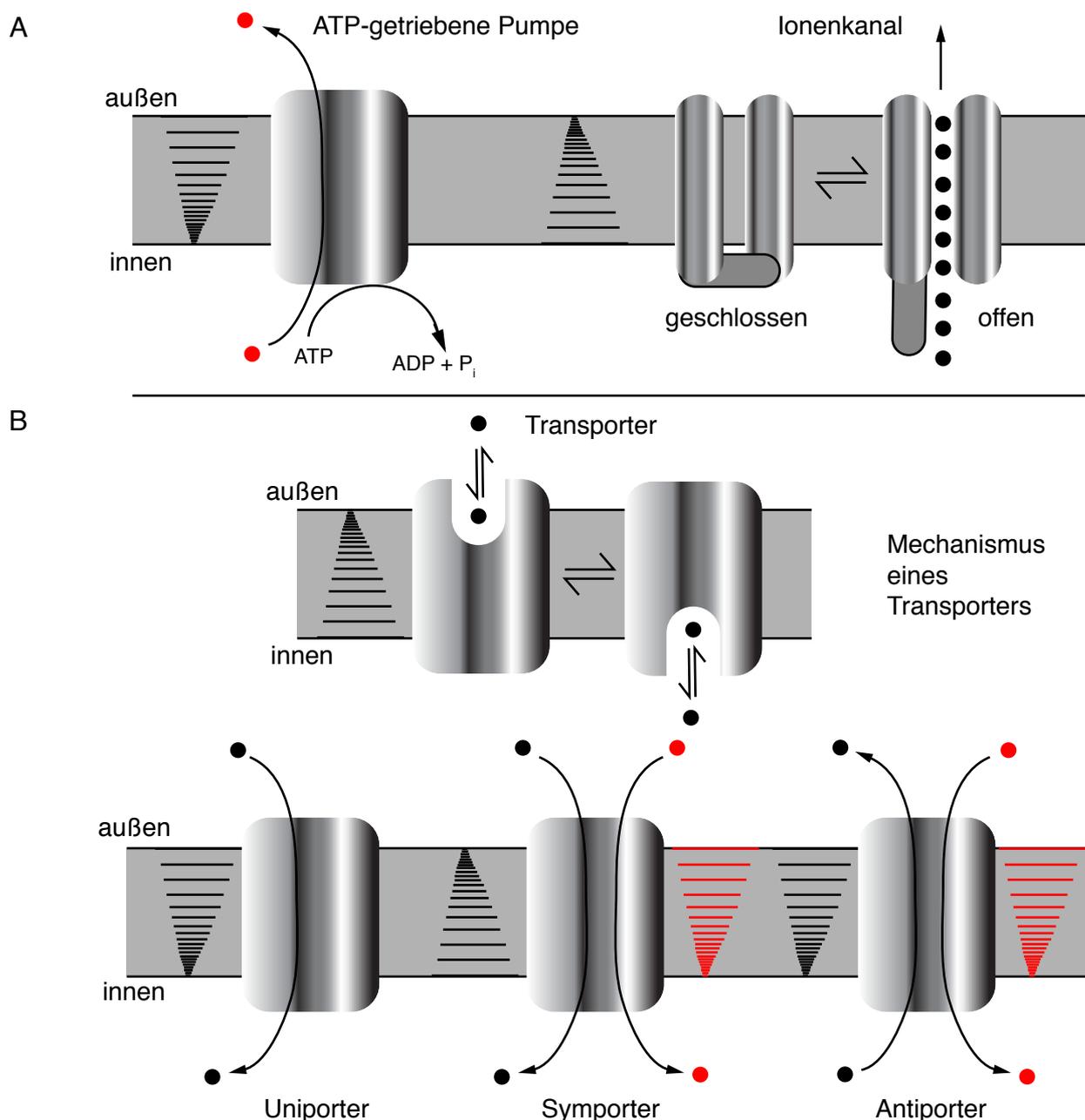
Für einige Membranproteine ist die korrekte Zusammenlagerung der Protein-Untereinheiten eine Bedingung für den effizienten ER-Export. So gelangt ERGIC-53 Protein, welches durch eine Mutation keine Heteromere ausbilden kann, niemals zum Golgi-Apparat. Möglicherweise verstärkt hier die Präsentation eines oligomeren Signals oder aber eine spezielle Konformation des Signals die Affinität zu COPII (Nufer et al, 2003). Bei anderen Proteinen führt die heteromere Oligomerisierung dazu, dass auch eine Untereinheit, die kein ER-Export-Signal trägt, effizient vorwärts transportiert wird (Kir3.1, Ma et al, 2003). Weiterhin kann die korrekte Zusammenlagerung von einzelnen ER-Rückführungs-Signale- exponierenden Protein-untereinheiten zur Maskierung dieser Signale führen, so dass der Holokomplex an die

Plasmamembran transportiert werden kann (Zerangue und Schwappach, 1999; Margeta-Mitrovic et al, 2000). Im Gegensatz zur Maskierung durch die anderen Untereinheiten, haben Studien an oligomeren  $K^+$ -Kanälen eine externe Komponente aufgefunden, die den Vorwärtstransport dieser Proteine reguliert: Zytosolische dimere 14-3-3-Proteine binden an korrekt oligomerisierte Proteinkomplexe und verhindern möglicherweise so, dass COPI mit den Arginin-haltigen ER-Lokalisationssignalen in den einzelnen Untereinheiten interagieren kann. Die Bindung von 14-3-3-Proteinen ermöglicht den Weitertransport des Proteins zur Zelloberfläche. Nur falsch zusammengelagerte oder unvollständige Proteinkomplexen interagieren mit COPI und werden daher über die entsprechenden Vesikel zum ER zurücktransportiert (O'Kelly et al, 2002; Yuan et al, 2003).

Ob über den Gebrauch eines Cargo-Rezeptors, der den Faltungszustand feststellt, über die korrekte Präsentation eines oligomeren Signals oder über die Maskierung von ER-Lokalisationssignalen als Indiz für die korrekte Assemblierung von Untereinheiten, die Zelle stellt mit verschiedensten Methoden sicher, dass nur legitimierte Transportsubstrate zum vorgesehenen Kompartiment gelangen. Der retrograde Transportweg ermöglicht darüber hinaus eine zusätzliche Qualitätssicherung, in dem er falsch zusammengesetzten Proteinkomplexen eine zweite Chance gibt, im ER die richtige Konformation zu erhalten

## 1.2 Transport zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum

Wie schon zu Anfang erwähnt, grenzt sich die eukaryotische Zelle als Ganzes durch die Plasmamembran (bei Pflanzen und Pilzen außerdem durch eine zusätzliche Zellwand) vom extrazellulären Raum ab, während sich die einzelnen Zellorganellen durch eigene Membranen gegen das Zytosol der Zelle abgrenzen. Die grundlegende Struktureinheit dieser Biomembranen wird von einer Phospholipiddoppelschicht gebildet, in die, je nach Zelltyp bzw. Zellorganell weitere Lipide eingelagert sind. Der entscheidende Unterschied zwischen den Membranen liegt jedoch in ihrer individuellen Ausstattung an peripheren und integralen Membranproteinen. Integrale Membrantransportproteine spielen dabei eine wichtige Rolle als Kommunikatoren zwischen „innen“ und „außen“. Da die Phospholipiddoppelschicht selektiv permeabel ist, also einerseits Gase wie  $CO_2$  und  $O_2$  oder kleine Moleküle wie Ethanol frei passieren lässt (passive Diffusion), andererseits aber den meisten wasserlöslichen Stoffe wie Glukose, Aminosäuren und Ionen den freien Zutritt verweigert, bedarf es spezieller Vermittler, die den regulierten Austausch dieser Substanzen gewährleisten. Diese Aufgabe erfüllen Membrantransport-



**Abbildung 2: Membrantransportproteine und ihre Mechanismen.**

Schematische Darstellung der verschiedenen Typen von Membrantransportproteinen: ATP-getriebene Pumpen (A oben links), Ionenkanäle (A oben rechts) und Transporter (B oben und unten). Gradienten (elektrische und/oder chemische) sind durch Striche in Dreiecksform dargestellt, niedrige Werte befinden sich an der Spitze. Pfeile stellen die Transportrichtung dar, Punkte Ionen bzw. andere Moleküle. (A) Links: Die primär aktiven Transportproteine ATP-getriebene Pumpen nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um bestimmte Ionen/Moleküle gegen ihren elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Rechts: Ionenkanäle sind passive Transportproteine und erleichtern den Transport von Ionen bzw.  $H_2O$  entlang des elektrochemischen Gradienten durch die Ausbildung von Membran-ständigen Poren. Sie sind entweder offen oder geschlossen. (B) Transporter ändern durch die Bindung von Ionen oder kleinen Molekülen ihre Konformation (oben) und können so die Substrate von einer Seite auf die andere transportieren. Man unterscheidet zwischen Uniportern (unten links), die nur eine Substanz entlang eines Konzentrationsgradienten transportieren können, und sekundär aktiven Co-Transportern (unten Mitte und rechts), die die Beförderung eines Ions oder Moleküls gegen den Konzentrationsgradienten (schwarze Striche in Dreiecksform) mit dem Transport eines anderen Ions oder Moleküls entlang des Konzentrationsgefälles (rote Striche in Dreiecksform) energetisch koppeln. Bei Co-Transportern unterscheidet man wiederum Symporter, die zwei Substrate unterschiedlicher Natur gleichzeitig in einer Richtung transportieren (unten Mitte) von Antiportern, die den Transport in zwei verschiedene Richtungen ermöglichen (unten rechts).

-Proteine, deren hydrophobe Membrandomänen die Lipiddoppelschicht vollständig durchqueren (Lodish et al, 2001).

### 1.2.1 Membrantransportproteine

Als Vermittler zwischen „innen“ und „außen“ sind Membrantransportproteine unter anderem dafür verantwortlich, die Unterschiede in der Ionenzusammensetzung zwischen Zytosol (z.B. relativ hohe Konzentration an  $K^+$ -Ionen, dafür niedrige  $Na^+$ -,  $Cl^-$ - und  $Ca^{++}$ -Werte) und extrazellulärem Raum (z.B. relativ hohe Konzentration an  $Na^+$ -,  $Cl^-$ - und  $Ca^{++}$ - Ionen, dafür niedrige  $K^+$ -Werte) aufrechtzuerhalten. Die Ionengradienten und das elektrische Potential quer über die Plasmamembran, der elektrochemische Gradient, bilden die Grundlage vieler biologischer Prozesse.

Im Laufe der Evolution entstand eine Vielzahl spezifischer Transportproteine, die sich funktionell nach ihrer Abhängigkeit von einem Energielieferanten in aktive (primär aktive und sekundär aktive) und passive Transportproteine klassifizieren lassen. Zu den Letztgenannten kann man Kanalproteine (Ionenkanäle), welche eine erleichterte Diffusion von Substraten durch die Ausbildung membranständiger Poren ermöglichen (Abbildung 2 (A)). Bei Transportern unterscheidet man sekundär aktive (Cotransporter) und passive (Uniporter) Transporter (Abbildung 2 (B)). Adenosintriphosphat (ATP)-getriebene „Membranpumpen“ hingegen sind primär aktive Transportproteine (Abbildung 2 (A)).

**Transporter** verändern nach Bindung einiger weniger Substratmoleküle ihre Konformation und befördern so das Substrat auf die andere Seite der Membran. Man findet sowohl Uniporter, die jeweils nur ein Molekül entlang eines Konzentrationsgradienten transportieren (z.B. GLUT1), als auch Co-Transporter, die die Beförderung eines Ions oder Moleküls gegen den Konzentrationsgradienten mit dem Transport eines anderen Ions oder Moleküls entlang des Konzentrationsgefälles energetisch koppeln. Dabei können zwei Ionen/Moleküle unterschiedlicher Natur gleichzeitig in eine Richtung (z.B. der Zwei-Natrium/Eine-Glukose-Symporter) oder aber in entgegengesetzte Richtung transportiert werden (z.B. der  $Cl^-/HCO_3^-$ -Antiporter, AE1).

Viele **Membranpumpen oder Ionenpumpen** nutzen die Energie einer ATP-Hydrolyse, um eine energetisch ungünstige Translokation von Ionen oder kleinen Molekülen gegen einen chemischen Konzentrationsgradienten oder ein elektrisches Potential voranzutreiben. Während die ATP-getriebenen Pumpen der Klassen P, E und V hauptsächlich Ionen befördern, können es bei Proteinen der ABC-Superfamilie auch kleine Moleküle sein. Die  $Na^+/K^+$ -ATPase in der

Plasmamembran gehört zu den aus zwei Untereinheiten bestehenden Ionenpumpen der P-Klasse, die sich durch die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit im Verlauf des Transportprozesses auszeichnet. Komplizierter gestaltet sind ATPasen der F- und V-Klasse, Protonenpumpen, die aus mindestens drei verschiedenen Membranprotein-Untereinheiten und mindestens fünf weiteren Polypeptiden - verantwortlich für die Ausbildung der zytosolischen Domäne - bestehen.  $V_0V_1$ -ATPasen sorgen in pflanzlichen Vakuolen sowie in Lysosomen tierischer Zellen für einen sauren pH-Wert, hingegen dient der durch  $F_0F_1$ -ATPasen erzeugte Protonengradient in Mitochondrien und Chloroplasten der Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat, man kann also von ATP-Synthasen sprechen. Die größte Klasse wird von Proteinen der ABC(ATP-Binde-Kassette)-Superfamilie gebildet, eine Familie mit Vertretern in allen bekannten Organismen von Bakterien bis zu Säugern, die eine Vielzahl chemisch diverser Substrate von Ionen über Lipide und sekundäre Metabolite bis hin zu Giftmolekülen durch Membranen hindurchschleust (Higgins, 1992). Die ca. 65 humanen ABC-Transportproteine werden in sieben Untergruppen aufgeteilt. Obwohl die Mehrheit dieser Proteine Energie-abhängige Transporter sind, umfasst die Superfamilie auch Mitglieder wie den Ionenkanal CFTR (Cystische-Fibrose-Transmembran-Leitungs-Regulator) oder die ATP-sensitiven Kanalmodulatoren SUR1 und SUR2 (Sulfonylharnstoff-Rezeptoren; siehe  $K_{ATP}$ -Kanäle) (Deeley et al, 2005). Mutationen in ABC-Genen sind an der Ausbildung verschiedener Krankheiten beteiligt, darunter Mukoviszidose (CFTR) und veränderte Medikamenten-Suszeptibilität (MRP1/2/4/5). ABC-Proteine sind aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut, den hydrophoben Membrandomänen und den hydrophilen Nukleotidbindungsdomänen, den ATP-Bindekassetten.

Alle Klassen von ATPasen besitzen auf der zytosolischen Seite der Membran mindestens eine ATP-bindende Region. Die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie wird direkt in den Transport von Substraten gegen ein Potential oder einen Konzentrationsgradienten umgesetzt.

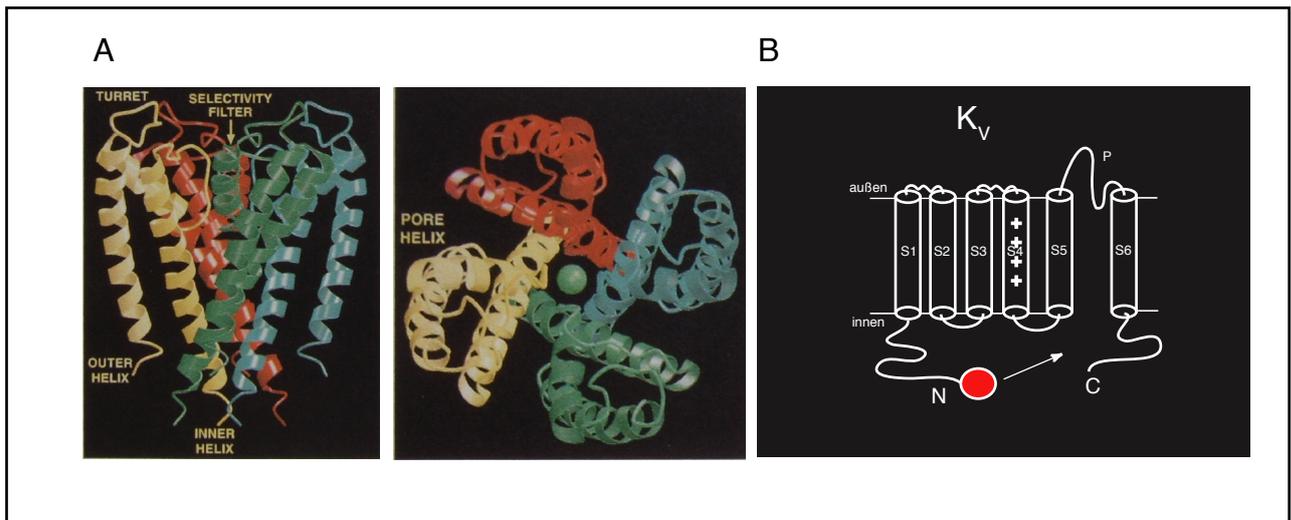
**Kanalproteine** transportieren Wasser oder Ionen als Reaktion auf einen chemischen, elektrischen oder mechanischen Stimulus durch Poren-bildende Transmembrandomänen und nutzen dabei den durch Ionenpumpen erzeugten elektrochemischen Gradienten. Ionen-transportierende Kanalproteine werden auch als Ionenkanäle bezeichnet. Da diese Arbeit auf der Untersuchung der Interaktion von Ionenkanälen mit 14-3-3-Proteinen basiert, werden diese im folgenden Kapitel ausführlicher betrachtet.

## 1.3 Ionenkanäle

Ionenkanäle bilden Membranporen mit einer Art „Pforte“ (gate), deren Öffnen und Schließen (gating) entweder intrinsisch ist, durch Bindung eines Liganden oder durch Änderungen des Membranpotentials reguliert wird. Sie agieren in so unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Nerv- und Muskelzellerregung, Hormonsekretion, sensorische Transduktion, Zellproliferation, Kontrolle des Salz- und Wasserhaushaltes oder Regulation des Blutdruckes (Ashcroft, 2006). Ihre Einbindung in zahlreiche physiologische Prozesse impliziert eine strikte Regulation auf unterschiedlichen Ebenen, angefangen bei der selektiven Expression in spezialisierten Geweben, über die Kontrolle der Kopienzahl am Ort ihrer Aktivität bis hin zu den Regulationsmechanismen der Öffnungswahrscheinlichkeit der Pore und der Ionen-Selektivität.

Spannungs-gesteuerte und die Liganden-gesteuerte Ionenkanäle bilden die zwei größten Hauptklassen von Ionenkanälen. Spannungsgesteuerte Kanäle öffnen sich in Abhängigkeit von Änderungen des Membranpotentials und können mit z.T. außergewöhnlicher Geschwindigkeit (bis  $10^8$  Ionen/Sekunde bei spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanälen) und höchst selektiv mehrere Ionenarten gleichzeitig transportieren. Liganden-abhängige Ionenkanäle bleiben so lange geschlossen, bis ein Ligand (z.B. Acetylcholin) an die für ihn vorgesehene Stelle im Protein bindet. Dabei können die Bindestellen entweder extrazellulär (bei Neurotransmitter-Liganden) oder intrazellulär (bei zellulären Botenstoffen z.B. Adenosintriphosphat (ATP)) liegen.

Die erste Röntgenkristallstruktur eines Ionenkanals wurde 1998 beschrieben (Doyle et al, 1998), es handelte sich hierbei um einen  $K^+$ -Kanal aus dem Bakterium *Streptomyces lividans*. Im Grundbauplan entsprechen alle Poren-bildende Ionenkanäle dieser Struktur (Abbildung 3 (A)). Eine variable Anzahl von Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices bildet die Kanaluntereinheiten ( $\alpha$ -Untereinheiten), die in der Membran um eine Pore angeordnet sind. Bei  $Na^+$ - und  $Ca^{++}$ -Kanälen entspricht eine einzelne Transmembrandomäne einer  $K^+$ -Kanal- $\alpha$ -Untereinheit, und vier solcher homologer Domänen (sogenannte repeats), verbunden durch nicht-homologe zytosolische Sequenzen bilden als eine einzige Untereinheit die Pore. Zwischen den Helices befinden sich sogenannte P-Segmente (oder H5), welche die Pore auskleiden und sowohl helikale als auch nicht-helikale Abschnitte enthalten. Eine Schleifenstruktur in den P-Segmenten bildet den ionenselektiven Filter. Die P-Segmente können weitere extrazelluläre oder intrazelluläre Module aufweisen, die als „Andock-Stellen“ für Liganden, akzessorische Untereinheiten oder andere Modulatoren dienen (z.B. beim Glutamatrezeptor) (Ashcroft, 2006). Aminoterminale Segmente können eine globuläre Domäne ausbilden, die als Verschlusskappe fungiert. Bei Spannungs-gesteuerten Ionenkanälen übernimmt eine der  $\alpha$ -Helices (oft das  $\alpha$ -



### Abbildung 3: Architektur eines Kaliumkanals

(A) Spiralförmige Darstellung der tetrameren Struktur des bakteriellen Kaliumkanals KscA in der Membranebene (aus Doyle et al, 1998). Die vier Untereinheiten sind durch unterschiedliche Farben repräsentiert. KscA hat nur zwei Transmembransegmente ( $\alpha$ -Helices), die durch die Poren-bildende und eine „Turret“- (Wächter) Schleife miteinander verbunden sind. Trotzdem ist seine Aminosäuresequenz der von Spannungs-gesteuerten Kalium-Kanälen (B) ähnlicher als der von anderen  $K^+$ -Kanälen (z.B. Kir), die auch nur zwei Transmembransegmente haben. Links: Die äußere  $\alpha$ -Helix (outer helix) entspricht der S1-Domäne, die innere der S2-Domäne (siehe B). Die vier S2-Domänen bilden eine invertierte Teepee-ähnliche Struktur aus. Die Position des  $K^+$  Selektivitätsfilters, der von einer Sequenz gebildet wird, die die Poren-bildende Region mit der S2-Domäne verbindet, ist durch einen Pfeil markiert. Rechts: Aufsicht auf den KscA-Kanal von der extrazellulären Seite aus. Es sind die Poren-bildenden Schleifen der vier Untereinheiten sowie ein  $K^+$ -Ion (grüne Kugel) dargestellt.

(B) Topologie des spannungs-abhängigen Kv1-Kalium-Kanals, gebildet von sechs Transmembransegmenten (S1-S6). Die  $\alpha$ -Helix S4 dient als Spannungsfühler (durch + gekennzeichnet), die P-Region bildet die Kanalpore. Der distale N-Terminus enthält eine Aminosäureabfolge, die als Verschlusskappe oder -ball (als Kreis dargestellt) funktioniert und die Inaktivierung des Kanals initiiert. Ferner ist der N-Terminus für die Tetramerisierung der  $\alpha$ -Untereinheiten verantwortlich und trägt ein Motiv für die Interaktion mit einer  $\beta$ -Untereinheit.

Segment S4) die Funktion eines Spannungsfühlers (Abbildung 3 (B)). Die engste Stelle der Kanalpore - der sogenannte Selektivitätsfilter (siehe Abbildung 3 (A)) – kann bei Spannungsgesteuerten Ionenkanälen von den Ionen nur passiert werden, wenn sie ihre Hydrathülle abgestreift haben. Im Selektivitätsfilter von  $K^+$ -Kanälen kommt es zu einer elektrostatischen Wechselwirkung von Ion und polaren Gruppen des Peptid-Rückgrats. Auf der anderen Seite übernehmen dann wieder Wassermoleküle das Ion. Unterschiede in der Hydratationsenergie – die Energie der Wechselwirkung zwischen Ion und Wasser – sind eine Grundlage der Ionenselektivität der Kanäle. Bei Liganden-gesteuerten Ionenkanälen ist die Pore so weit, dass z.B. im Falle des Acetylcholinrezeptors  $Na^+$  oder  $K^+$ -Kationen z.T. zusammen mit ihrer Hydrathülle den Kanal passieren können (Ashcroft, 2006).

Das Öffnen und Schließen eines Ionenkanals wird als Gating bezeichnet und beschreibt die Konformationsmöglichkeiten des Proteins. Im geschlossenen Zustand ragt eine „Gate“-Domäne in die Porenregion. Bindet ein Ligand oder ändert sich die Membranspannung erfährt der Kanal eine Konformationsänderung, so dass die Pore geöffnet wird und die Ionen passieren können. Eine erneute Konformationsänderung bewirkt den Porenschluss. Studien am Spannungsgesteuerten Kv1 (Skaker)-Kanal haben gezeigt, dass die Verlagerung einer N-terminalen globulären Domäne (Ball) in die Kanalöffnung zur Inaktivierung führt (N-Typ-Inaktivierung). Nach einigen Millisekunden bewegt sich der Ball zurück und das Protein geht in seinen geschlossenen Ruhezustand über. Beim nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) ändert sich die Konformation durch die Verschiebung einer Untereinheit relativ zur anderen. Diese Konformationsänderung muss sich durch das gesamte Protein hindurchziehen um eine Kanalöffnung zu bewirken, denn die Liganden-Bindestelle für Acetylcholin und die Pore liegen ca. 50 Angström voneinander entfernt (Ashcroft, 2000).

### 1.3.1 Kalium-Kanäle

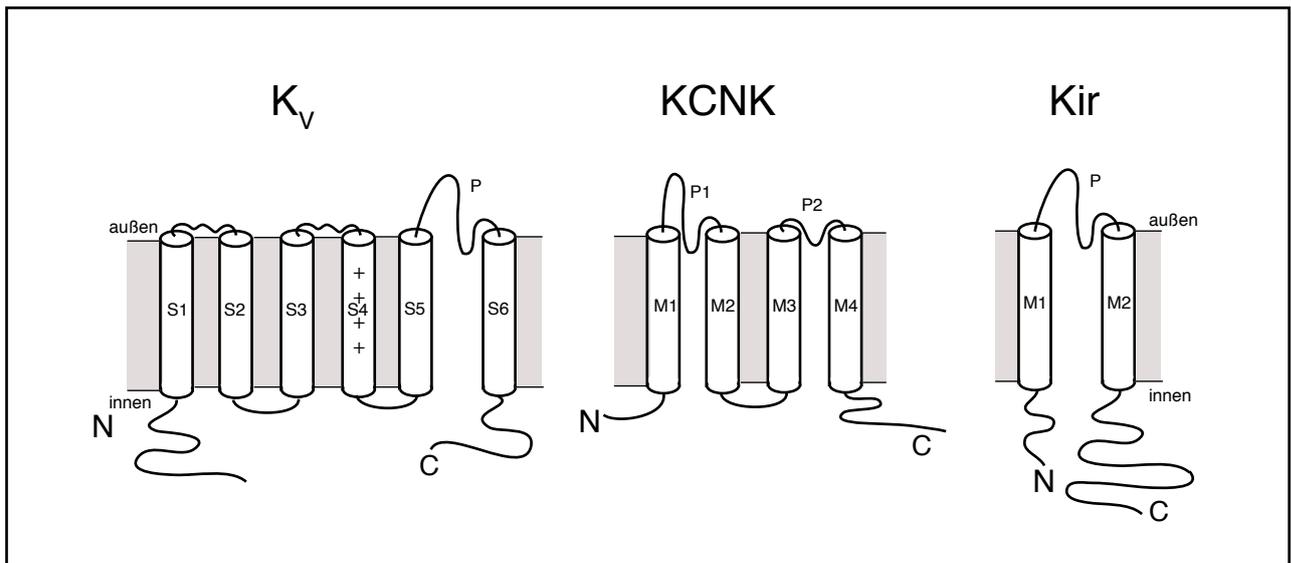
Alleine im menschlichen Genom finden sich mehr als 50 verschiedene Gene, die für Kaliumkanäle kodieren. Dank ihrer genetischen Vielfalt und der Abundanz in allen Geweben und Organen sind sie an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Aufrechterhaltung des Membranpotentials, Frequenz und Verlauf von Aktionspotentialen, Sekretion und Signaltransduktion beteiligt. Ein funktionsfähiger Kaliumkanal wird durch die Zusammenlagerung von homomeren oder heteromeren Untereinheiten gebildet, wobei bis zu vier primäre oder  $\alpha$ -Untereinheiten den Kanal bilden. Weitere  $\beta$ - oder akzessorische Untereinheiten können mit den  $\alpha$ -Untereinheiten assemblieren. Strukturell lassen sich Kalium-

Kanäle in drei bis vier größere Gruppen einteilen, die sich jeweils in der Anzahl der die  $\alpha$ -Untereinheiten bildenden Transmembrandomänen unterscheiden (Abbildung 4). In der Gruppe der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Inwardly rectifying potassium channels Kir) wird die  $\alpha$ -Untereinheit von den zwei Transmembrandomänen M1 und M2 gebildet, die verbindende Poren-formende  $\alpha$ -Helix (H5 oder P-Segment) weist ein Motiv auf, das allen Kaliumkanälen gemein ist und die  $K^+$ -Ionenselektivität bestimmt, die „Kalium-Signatur-Sequenz“ „TXGXG“. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen auf der zytosolischen Seite (Abbildung). Zur Gruppe der vier Transmembrandomänen aufweisenden  $K^+$ -Kanäle gehören die KCNK (oder K2P) -Proteine. Sie unterscheiden sich von den anderen durch eine zweite Poren-formende (P)-Domäne. Die Gruppe mit aus jeweils sechs Transmembrandomänen gebildeten  $\alpha$ -Untereinheiten umfasst z.B. Spannungs-gesteuerte Kv-Kanäle, eag (ether à go-go)-verwandte Kanäle und KCNQ-Kanäle; sieben Transmembransegmente weisen  $Ca^{++}$ -aktivierte Kaliumkanäle auf, deren Aminoterminus dadurch extrazellulär zu liegen kommt.

#### 1.3.1.1 KCNK-Kanäle

Die Zwei-Poren-Kanäle (K2P) der KNCK-Familie funktionieren als hoch regulierte  $K^+$ -selektive „Leck“ (leak)-Kanäle.  $K^+$ - Leck- oder Hintergrundströme kontrollieren die Erregbarkeit von Zellmembranen, indem sie die Länge, die Frequenz und die Amplitude von Aktionspotentialen modulieren, nicht zuletzt durch ihren Einfluss auf das Ruhemembranpotential (Goldstein et al, 2001). KCNK-Kanäle verhalten sich wie  $K^+$ -selektive Löcher in einem elektrischen Feld, sind offene „Gleichrichter“ (open rectifier), d.h. die durch sie vermittelten Ströme verlaufen linear als eine Funktion der Spannung, wenn die  $K^+$ -Konzentrationen innen und außen gleich sind. Unter physiologischen Bedingungen, wenn also die  $K^+$ -Konzentration intrazellulär viel höher ist als extrazellulär, sind sie jedoch stark nach außen gerichtet. Tatsächlich sind die „offenen Gleichrichter“ keinesfalls immer offen, ihre Aktivität ist strikt reguliert durch chemische und physikalische Stimuli wie z.B. mechanische Dehnung, Temperatur, pH-Wert, Neurotransmitter oder Lipide (Plant et al, 2005).

Fünfzehn *KCNK*-Säugergene codieren für K2P-Kanäle, welche überall im Körper exprimiert werden, schwerpunktmäßig aber im Zentralen Nervensystem. Die Untereinheiten werden von vier Transmembransegmente und zwei P-Schleifen gebildet, jeweils zwei Untereinheiten bilden eine  $K^+$ -selektive Pore (Abbildung 4). Der relativ kurze Aminoterminus ebenso wie der lange Carboxyterminus liegen intrazellulär, letzterer vermittelt die Sensitivität gegenüber Regulatoren wie z.B. flüchtigen Anästhetika. Wie bei allen Ionenkanälen ist ihre Aktivität einer strikten Regulation unterworfen. So wird z.B. KCNK1(K2P1) durch die Interaktion mit SUMO (reversibel)



#### Abbildung 4: Topologie von Kaliumkanälen.

Topologie der  $\alpha$ -Untereinheiten, die drei verschiedenen Kalium-Kanäle ausbilden: Spannungs-gesteuerte Kalium-Kanäle (KV), Zwei-Poren-Kalium-Kanäle (KCNK oder K2P) und Einwärts-Gleichrichter-Kalium-Kanäle (Kir). Bei allen liegt sowohl der N- als auch der C-Terminus auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran. KV-Kanal-Untereinheiten besitzen sechs Transmembransegmente und eine Poren-bildende Region (P). Das vierte Transmembransegment (S4) ist positiv geladen und dient als Spannungsfühler. KCNK-Proteine zeichnen sich durch die Existenz von zwei Kanal-bildenden Poren-Regionen aus und ihre Untereinheiten werden von vier Transmembransegmenten gebildet. Sie sind sogenannte offene „Gleichrichter“, d.h. die durch sie vermittelten Ströme verlaufen linear als eine Funktion der Spannung, wenn die K<sup>+</sup>-Konzentrationen innen und außen gleich sind. Unter physiologischen Bedingungen, wenn die K<sup>+</sup>-Konzentration intrazellulär viel höher ist als extrazellulär, sind sie jedoch stark nach außen gerichtet. Die  $\alpha$ -Untereinheiten von Kir-Kanälen werden nur von zwei Transmembransegmenten gebildet, die durch eine Poren-bildende Region miteinander verbunden sind. Sie zeichnen sich durch das Phänomen des „Einwärts-Gleichrichtens“ aus, eine Eigenschaft, die in elektrophysiologischen Experimenten bei künstlich konstant gehaltenem Membranpotential beobachtet werden kann: dann fließen Kanäle K<sup>+</sup>-Ionen überwiegend in die Zelle hinein und nicht aus der Zelle heraus.

modifiziert, während K2P2 vom Leck-Kanal zum Spannungs-abhängigem Kanal konvertiert, je nachdem, ob eine Aminosäurestelle von der Protein-Kinase-A (PKA) phosphoryliert wird oder nicht (letzteres bedingt Leck-Ströme). Die Anzahl der Proteine in der Plasmamembran wird z.B. durch die zytosolischen 14-3-3-Proteine festgelegt. Die KCNK3 (TASK1)- und KCNK9 (TASK3)-Kanäle teilen nicht nur Sequenzhomologien und ihre Sensitivität gegenüber extrazellulärer Ansäuerung, sondern auch die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen, die den Vorwärtstransport zur Zelloberfläche kontrollieren (O'Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002; Renigunta et al, 2006). Eine di-basische Sequenz im Kanal-N-Terminus führt zur Interaktion mit COPI-Vesikeln und bewirkt die Lokalisation im ER. Wird ein Serin-Rest im C-Terminus phosphoryliert, können die dimeren Kanäle mit den ebenfalls dimeren 14-3-3-Proteinen interagieren und daraufhin das ER in Richtung Plasmamembran verlassen. Ein weiterer Bindungspartner von TASK1 ist das Adaptorprotein p11. Dieses Protein stellt möglicherweise eine Art „Retentionsfaktor“ dar, denn TASK1-Kanäle und –Reporterproteine ohne p11-Bindedomäne werden verstärkt an die Zelloberfläche transportiert (Renigunta et al, 2006).

### **1.3.1.2 Kir-Kanäle, die Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle**

Ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa aufweisende Kir-Proteine (inwardly rectifying potassium channels) bilden eine sechs Unterfamilien (Kir1 bis Kir6) umfassende Familie von Spannungs-unabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen, denen die Eigenschaft des „Einwärts-Gleichrichtens“ gemeinsam ist: Im elektrophysiologischen Experiment werden bei künstlich konstant gehaltenem Membranpotential die K<sup>+</sup>-Ionen überwiegend von der extrazellulären zur intrazellulären Seite geleitet oder anders formuliert, der durch Hyperpolarisation hervorgerufene Einwärts-gerichtete K<sup>+</sup>-Strom ist größer als der durch Depolarisation hervorgerufene (Ashcroft, 2000). Das Einwärts-Gleichrichten resultiert aus einer Blockierung durch intrazelluläre (Mg<sup>++</sup>-und Polyamin-)Kationen, die unter dem Einfluss einer Spannung in den zytosolisch orientierten Teil der Pore strömen und so den Auswärtsstrom von K<sup>+</sup>-Ionen verhindern. Je größer die Affinität für blockierende Kationen, desto stärker der Effekt des Einwärts-Gleichrichtens. Einige Kir-Kanäle, z.B. Kir2.1 und Kir3.1 sind starke, andere wie Kir1.1 und Kir6.2 schwache Einwärtsgleichrichter. Unter physiologischen Bedingungen stabilisieren diese Kanäle das Ruhemembranpotential nahe dem K<sup>+</sup>-Gleichgewichtspotential und ermöglichen den Transport von K<sup>+</sup>-Ionen durch Membranen. Die Aktivität vieler Kir-Proteine wird über zytosolische Agonisten und Antagonisten moduliert, z.B. über G-Proteine oder Adenosintriphosphat (ATP) (Nichols und Lopatin, 1997). Im Vergleich zu ihrer funktionellen Diversität sind Kir-Kanäle strukturell homolog (Abbildung 4 und Abbildung 5 (A)). Wie bei den Spannungs-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanälen wird die Pore der Kir-Proteine von vier

Untereinheiten gebildet, wobei eine Untereinheit jedoch nur zwei Transmembransegmente (TM1 und TM2) aufweist. TM1 und TM2 korrespondieren mit den S5- und S6-Domänen der Spannungs-gesteuerten K<sup>+</sup>-Kanälen, die bei letzteren entscheidende S4-Domäne fehlt jedoch, was möglicherweise die geringe Abhängigkeit der Kir-Öffnungswahrscheinlichkeit von der Spannung erklärt (Ashcroft, 2000). Eine Poren-formende Schleife (P-Loop) verbindet die hydrophoben Domänen und ist den P-Loops (oder der H5-Region) anderer K<sup>+</sup>-Kanäle sehr ähnlich (siehe Abschnitt 1.3.1). Es kommt zur Ausbildung von Homomeren oder Heteromeren, wobei die Heteropolymerisation sich vornehmlich zwischen Mitgliedern der gleichen Subfamilie ereignet und die Kanal-Aktivität entweder reduzieren oder verstärken kann (Ashcroft, 2000). Anders als bei den meisten Einwärts-Gleichrichtern resultiert die heterologe Expression von Kir6.1 oder Kir6.2 alleine nicht in funktionellen Kanälen. Diese Proteine benötigen eine zusätzliche  $\beta$ -Untereinheit, den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), welcher mit der  $\alpha$ -Untereinheit Kir im Verhältnis vier zu vier assembliert und einen oktameren Kanal-Komplex ausbildet, den ATP-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanal.

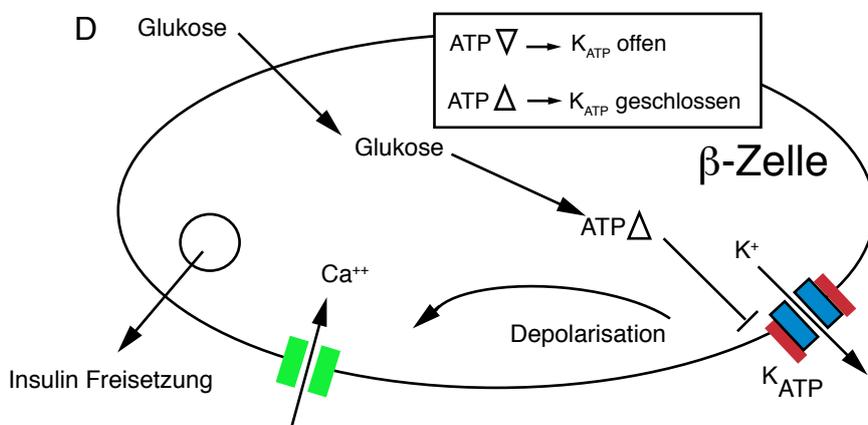
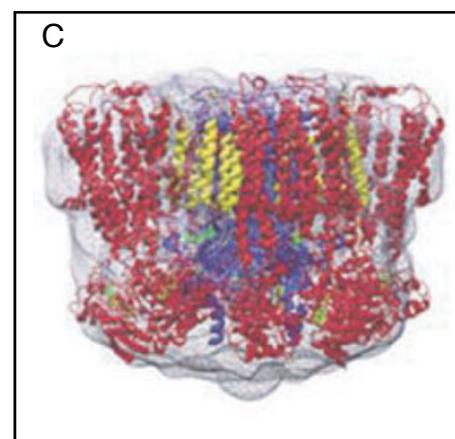
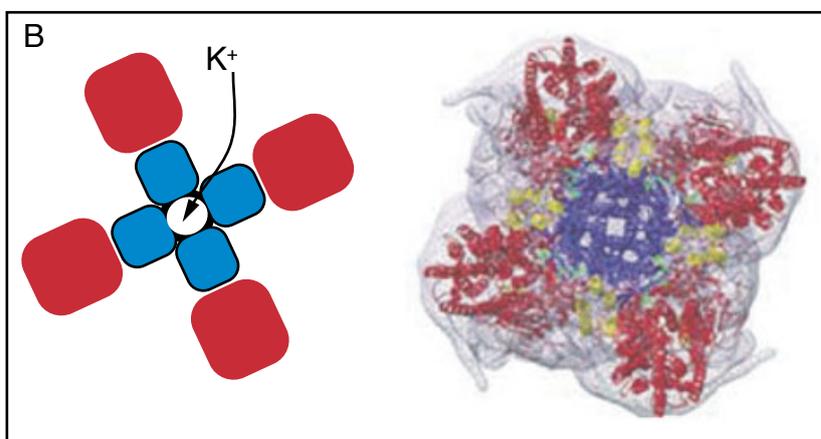
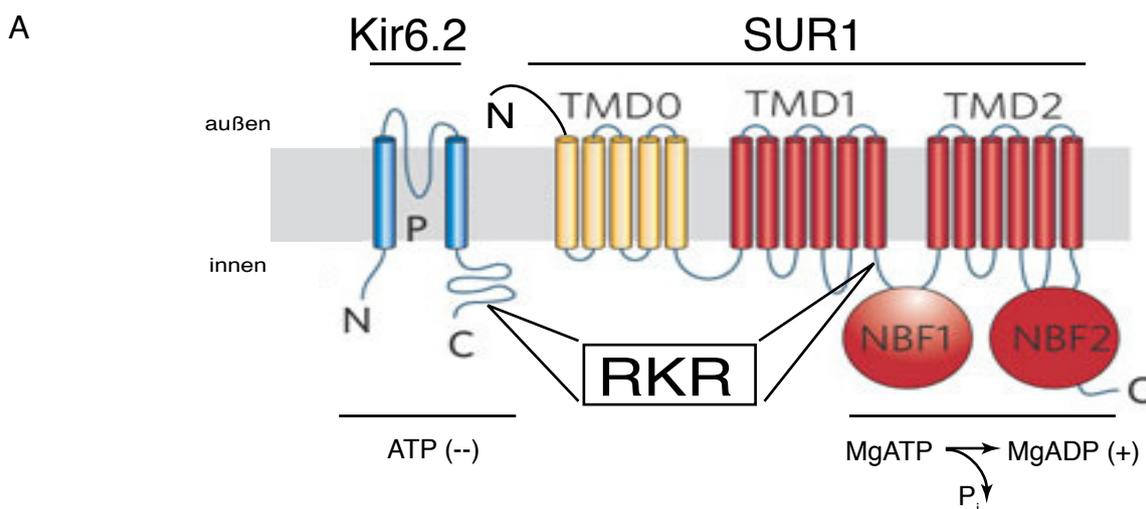
## 1.4 K<sub>ATP</sub>-Kanäle

ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle werden in zahlreichen Geweben exprimiert, sowohl in pankreatischen  $\beta$ -Zellen, in Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen als auch in der glatten vaskulären Muskulatur und in Neuronen. Jeder K<sub>ATP</sub>-Kanalkomplex setzt sich aus vier Untereinheiten des regulatorischen Sulfonylharnstoffrezeptors SURx und vier Untereinheiten des Kanal-bildenden Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanals Kir6.x (Isoform 1 oder 2) zusammen (Abbildung 5 (A-C)). Es gibt zwei SUR-Gene, *SUR1* und *SUR2* und mehrere SUR2-Spleiss-Varianten, hauptsächlich aber die sich in den letzten 42 Aminosäuren unterscheidenden SUR2A und SUR2B. Unterschiedliche Kombinationen von Kir6.2-(/Kir6.1-)Homotetrameren mit SUR-Isoformen bilden K<sub>ATP</sub>-Kanäle mit unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften, so werden K<sub>ATP</sub>-Kanäle in Pankreas, Gehirn und Neuronen vornehmlich von SUR1 und Kir6.2 gebildet, Herz- und Skelettmuskel-K<sub>ATP</sub>-Kanäle von SUR2A und Kir6.2 und K<sub>ATP</sub>-Kanäle in glatten Muskelzellen von SUR2B und Kir6.1 oder SUR2B und Kir6.2. Da die aus SUR1 und Kir6.2 gebildeten K<sub>ATP</sub>-Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas am besten charakterisiert sind und zudem Gegenstand unserer wissenschaftlichen Untersuchungen sind, wird im Folgenden von den Eigenschaften dieser K<sub>ATP</sub>-Kanäle bzw. den Eigenschaften der sie bildenden Untereinheiten die Rede sein.

$K_{ATP}$ -Kanäle nehmen in vielen Geweben eine Schlüsselfunktion ein als Bindeglied zwischen Stoffwechselprozessen und elektrischer Erregung an der Plasmamembran. So übersetzen sie in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Erhöhung des Blutzuckergehaltes in die Erregung der Zellmembran und bewirken dadurch die Insulinfreisetzung (Ashcroft und Gribble, 1999). Desweiteren sind sie an der Regulation des Tonus der glatten vaskulären Muskulatur, dem Schutz vor neuronalen Verletzungen, ischaemischem Stress im Herzen und Gehirn und an der Zuckeraufnahme im Skelettmuskel beteiligt. Dabei wird ihre Aktivität über die zytosolische ATP/ADP-Konzentrationen reguliert, wobei ATP inhibierende und MgADP stimulierende Wirkung zeigt (Abbildung 5 (A)). Am Beispiel der Insulinsekretion sei die Funktion der  $K_{ATP}$ -Kanäle ausführlicher erläutert (Abbildung 5 (D)):

Wenn der Blutzuckerspiegel z.B. nach Nahrungsaufnahme erhöht ist, wird Glukose mit Hilfe des Glukosetransporters GLUT2 in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas transportiert. Die Verstoffwechselung des Zuckers führt zu einem Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration, welche das Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle bewirkt. Die daraus resultierende Depolarisation der Plasmamembran führt zur Öffnung von Spannungs-abhängigen  $Ca^{++}$ -Kanälen und die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels initiiert die Freisetzung von Insulin in den Blutkreislauf. Bei niedrigem Blutzucker sind die  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiv und halten durch den  $K^+$ -Auswärtsstrom die Membran auf einem hyperpolarisierten Niveau.

Die Kanalbildenden Isoformen **Kir6.2** und Kir6.1 sind zu 65% (auf Aminosäurebasis) identisch. Während Kir6.1 nur in der glatten Muskulatur und in einigen spezialisierten Zellen des Gehirns vorkommt, bildet Kir6.2 hingegen in den meisten  $K_{ATP}$ -exprimierenden Geweben die Kanal-Untereinheit dieser Proteine. Wie schon zuvor beschrieben, wird eine Kanaluntereinheit von zwei Transmembransegmenten (TM1 und TM2), verbunden durch eine Poren-formende Schleife, gebildet. Der N- als auch der fast die Hälfte des Proteins ausmachende C-Terminus liegen intrazellulär (Abbildung 5 (A)). Diese beiden zytosolischen Domänen interagieren miteinander und bilden Bindetaschen für das den  $K_{ATP}$ -Kanal inhibierende ATP (Shi et al, 2005). Dabei spielen bestimmte Aminosäuren im C-Terminus einer Kir6.2-Untereinheit (R201 und K185), als auch eine im N-Terminus der darauffolgenden 6.2-Untereinheit (R50) eine Rolle, jede N-terminale Domäne kontrolliert somit zwei ATP-Bindestellen. Nahe dieser Bindestellen findet auch die Interaktion von Kir6.2 mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) statt. Dabei bindet höchst wahrscheinlich entweder  $PIP_2$  (stabilisiert den „offenen“ Zustand) oder ATP (stabilisiert den „geschlossenen“ Zustand) (Antcliff und Haider et al, 2005; Nichols, 2006). Der N-Terminus und TM1 von Kir6.2 vermitteln die Assemblierung mit SUR1 (Schwappach und Zerangue et al, 2000).



**Abbildung 5:  $K_{ATP}$ -Kanäle werden von zwei unterschiedlichen Unter-einheiten gebildet.** (A) Schematische Darstellung der Untereinheiten Kir6.2 und SUR1, welche  $K_{ATP}$ -Kanäle z.B. in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und in Neuronen ausbilden. Kir6.2 ist ein sogenannter Einwärts-Gleichrichter- $K^+$ -Kanal und bildet die Pore des  $K_{ATP}$ -Kanals, welche durch ATP-Bindung blockiert wird. Der Sulfonyl-Harnstoffrezeptor SUR1 fungiert als regulatorische

$\beta$ -Untereinheit und bindet das den  $K_{ATP}$ -Kanal aktivierende MgADP. Beide Untereinheiten weisen ein Arginin-haltiges ER-Lokalisationssignal auf (RKR, die Position ist in der Abbildung hervorgehoben). Die Transmembransegmente von SUR1 sind hier zu Domänen zusammengefasst (TMD0 bis TMD2), NBF1 und NBF2 stellen Nukleotid-Bindungs-Domänen dar. P=Pore (aus Nichols, 2006). (B) Links: Schematische Aufsicht auf einen funktionellen  $K_{ATP}$ -Kanal, bestehend aus vier Kir6.2- (blau) und vier SUR1- (rot) Untereinheiten. Durch das Loch in der Mitte (Pore) können  $K^+$ -Ionen treten. Rechts: Darstellung einer Aufsicht des  $K_{ATP}$ -Kanal-Komplexes mit einer Auflösung von 18 Angström. Die Farben für die Untereinheiten entsprechen denen der Abbildung (A) (aus Mikhailov und Campbell, 2005). (C) Darstellung einer Seitenansicht (Membranebene) des  $K_{ATP}$ -Kanal-Komplexes (aus Mikhailov und Campbell, 2005). (D) Mechanismus der Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen: Ist der Blutzuckerspiegel erhöht, wird Glukose in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas transportiert. Die Verstoffwechslung des Zuckers führt zu einem Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration, welche das Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle bewirkt. Die daraus resultierende Depolarisation der Plasmamembran führt zur Öffnung von Spannungs-abhängigen  $Ca^{++}$ -Kanälen und die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels initiiert die Freisetzung von Insulin in den Blutkreislauf. Bei niedrigem Blutzucker (niedriger ATP-Konzentration) sind die  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiv und halten durch den  $K^+$ -Auswärtsstrom die Membran auf einem hyperpolarisierten Niveau.

Wie schon in Kapitel 1.2.1 erwähnt, gehört der Sulfonylharnstoffrezeptor **SUR1** zur Familie der ATP-Bindekassette (ABC)-Proteine, die sowohl als Transporter, als auch als Ionenkanäle (CFTR) und Kanalregulatoren agieren (Higgins, 2001). Alle ABC-Proteine besitzen vier strukturelle Domänen: Zwei Transmembrandomänen (TMD1 und TMD2) mit jeweils sechs bis acht Transmembran-Helices und zwei zytosolische Nukleotidbindungsdomänen (NBD1 und NBD2) in der die Membrandomänen verbindenden Schleifen (loop)- Region L1 und der C-terminalen Region (L2). Letztere sind hochkonserviert und enthalten ein Walker A- und Walker B-Motiv, separiert durch eine Linkersequenz, die als ABC-Signatursequenz bezeichnet wird, sowie eine Histidin- und eine Glutamin-Stelle (Campbell, et al, 2003). All diese NBD-Motive sind involviert in die Bindung und Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP). Während die meisten ABC-Proteine die Energie der ATP- Hydrolyse für die Aufnahme von Substraten über ihre Transmembrandomänen nutzen, agiert SUR1 einzigartigweise als Ionenkanalregulator ohne jegliche Transportfunktion. Stattdessen modulieren die mit den NBDs von SUR1 interagierenden Mg-Nukleotide (MgADP) das Öffnen und Schließen des  $K_{ATP}$ -Kanals (Abbildung 5 (A)) (Mikhailov und Campbell et al, 2005). Außerdem sind NBDs das Ziel einiger wichtiger therapeutischer Medikamente wie Sulfonylharnstoffe (sogenannte  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker) oder Diazoxide (sogenannte  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner) (Shi et al, 2005). Wie andere Mitglieder der ABCC8-Unterfamilie (CFTR und MRP1-3, 6, 7) hat SUR1 zusätzlich zu den zwei TMDs noch ein Carboxy-terminales Set von fünf Transmembranhelices, die TMD0 bilden (Abbildung 5 (A)). Diese zusätzliche Membrandomäne ist essentiell für die Kanalfunktion und die Assemblierung mit dem Transmembransegment 1 von Kir6.2. Strukturelle Analysen eines aufgereinigten  $K_{ATP}$ -Komplexes haben ergeben, dass die zytosolische L0-Schleife, die TMD0 und TMD1 verbindet, in der Nähe des zytosolischen N-Terminus von Kir6.2 zu liegen kommt (Antcliff und Haider, 2005). Der Aminoterminus von SUR1 befindet sich auf extrazellulärer Seite, enthält aber keine kanonische SRP-Erkennungsstelle (Neagoe und Schwappach, 2005). SUR1 existiert in unterschiedliche glykosylierten Formen: Eine „unreife“ Form von etwa 140 kDa Molekulargewicht unterscheidet sich von dem nur unter Koexpression mit Kir6.2 vollständig glykosyliertem SUR1 von etwa 170 kDa Molekulargewicht (Clement et al, 1997).

Wenngleich Kir6.2 die eigentliche  $\alpha$ -Kanal-Untereinheit ausbildet, erzeugt nur die Koexistenz beider Untereinheiten funktionelle Kanäle. Diese Tatsache beruht auf der Existenz von Arginin-enthaltenden Motiven in den zytosolischen Domänen beider  $K_{ATP}$ -Untereinheiten, in den letzten 26 Aminosäuren von Kir6.2 und vor dem Walker A-Motiv der Nukleotidbindungsdomäne 1 von SUR1 (Abbildung 5 (A)) (Zerangue und Schwappach et al, 1999). Nur in korrekt assembliertem Zustand können  $K_{ATP}$ -Kanäle das ER verlassen. Dabei spielt möglicherweise die Maskierung

der ER-Lokalisationssignale durch die jeweils andere Partneruntereinheit ebenso eine Rolle wie die kürzlich beschriebene Interaktion mit zytosolischen 14-3-3-Proteinen (Yuan et al, 2003). Experimente mit Kir6.2-Reporterproteinen haben eine konkurrierende Bindung von Coatomer-Komplex I(COP)-Proteinen und 14-3-3-Proteinen an die RKR-Sequenz des Kir6.2-C-Terminus ausgemacht. Dabei scheint die Erkennung durch COPI unter multimerer Assemblierung unbeeinflusst, die durch 14-3-3 verstärkt, was den Vorwärtstransport der Reporterproteine an die Plasmamembran zur Folge hat. Diese auf ER-Lokalisationssignalen basierende Qualitätskontrolle koppelt den Status der Assemblierung mit dem Verlassen des ER und stellt somit sicher, dass weder einzelne Unterreinheiten noch unvollständig oder falsch zusammengelagerte Unterreinheiten an die Zelloberfläche transportiert werden. Die Existenz anderer Transportsignale ist nicht ausgeschlossen, berichten doch manche Autoren von der Existenz eines ER-Export-Signals im C-Terminus von SUR1 (Sharma et al, 1999) oder von auf Tyrosinen oder Di-Leucinen basierenden Endozytosesignalen im Kir6.2 C-Terminus (Hu et al, 2003; Mankouri, Taneja und Smith et al, 2006).

#### 1.4.1 Polymorphismen im $K_{ATP}$ -Kanal und Diabetes

Genetische Mutationen in den Genen, die für Kir6.2 (*KCNJ11*) und SUR1 (*ABCC8*) kodierenden, bewirken abnormale Insulin-Sekretion. Sogenannte „Gain-of-Function“-Mutationen sind die Hauptverursacher des transienten oder permanenten frühkindlichem Diabetes mellitus (ND). Hier reduzieren Mutationen vorwiegend in *KCNJ11* den inhibierenden Effekt von ATP und verstärken gleichzeitig die stimulierende Wirkung von MgADP; der ansteigende  $K^+$ -Auswärtsstrom führt zur einer Hyperpolarisierung der Zellmembran der  $\beta$ -Zellen, wodurch der  $Ca^{++}$ -Influx und damit die Insulinsekretion unterdrückt wird. Die Folgen sind schwere Hypoinsulinaemie und Hyperglykaemie, also zuwenig Insulin und zuviel Glukose im Blut. Manche Mutationen stören entweder direkt die ATP-Bindung oder stabilisieren den offenen Kanal. Je nach Mutation aus Ausprägung kommt es zu unterschiedlich schweren Krankheitsbildern, die auch mit Epilepsie und Muskelschwäche einhergehen können (Ashcroft, 2006).

Es sind hauptsächlich Veränderungen in SUR1, die zu einem „Loss-of-Function“ führen, hervorgerufen durch (ca. 40 bekannte) Mutationen, die Proteintrunkationen oder die Herabsetzung der Affinität des Kanals für Mg-Nukleotide bewirken. Einige „Loss-of-Function“-verursachende Mutationen werden auch mit dem intrazellulären Transport von  $K_{ATP}$ -Kanälen in Verbindung gebracht. So wurde anhand der Mutation  $\Delta$ Phe-1388-SUR1 gezeigt, dass

Phenylalanin an Position 1388 sowohl wichtig für die MgADP-Sensitivität als auch für den Transport zur Plasmamembran ist (Cartier et al, 2003). Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Mutation L1544P in SUR1. Interessanterweise haben Versuche in COSm6-Zellen gezeigt, dass die Mutation der Arginin-Signale in beiden Untereinheiten den Phänotyp des beeinträchtigten Transportes zur Plasmamembran wieder aufheben konnte. Möglicherweise verhindert die Mutation das vollständige Verdecken des ER-Lokalisationssignals durch die Partneruntereinheit oder andere akzessorische Proteine wie 14-3-3 (Taschenberger et al, 2002). Die Folge der beeinträchtigten oder vollkommen aufgehobenen Kanalaktivität ist eine exzessive Insulinsekretion selbst bei einer nicht stimulatorisch wirkenden Glukose-Konzentration. Dies führt zu Krankheiten wie den sporadischen oder familiären kongenitalen Hyperinsulinismus (CHI), auch persistierende hyperinsulinaemische Hypoglykaemie der Kindheit (PHHI) genannt.

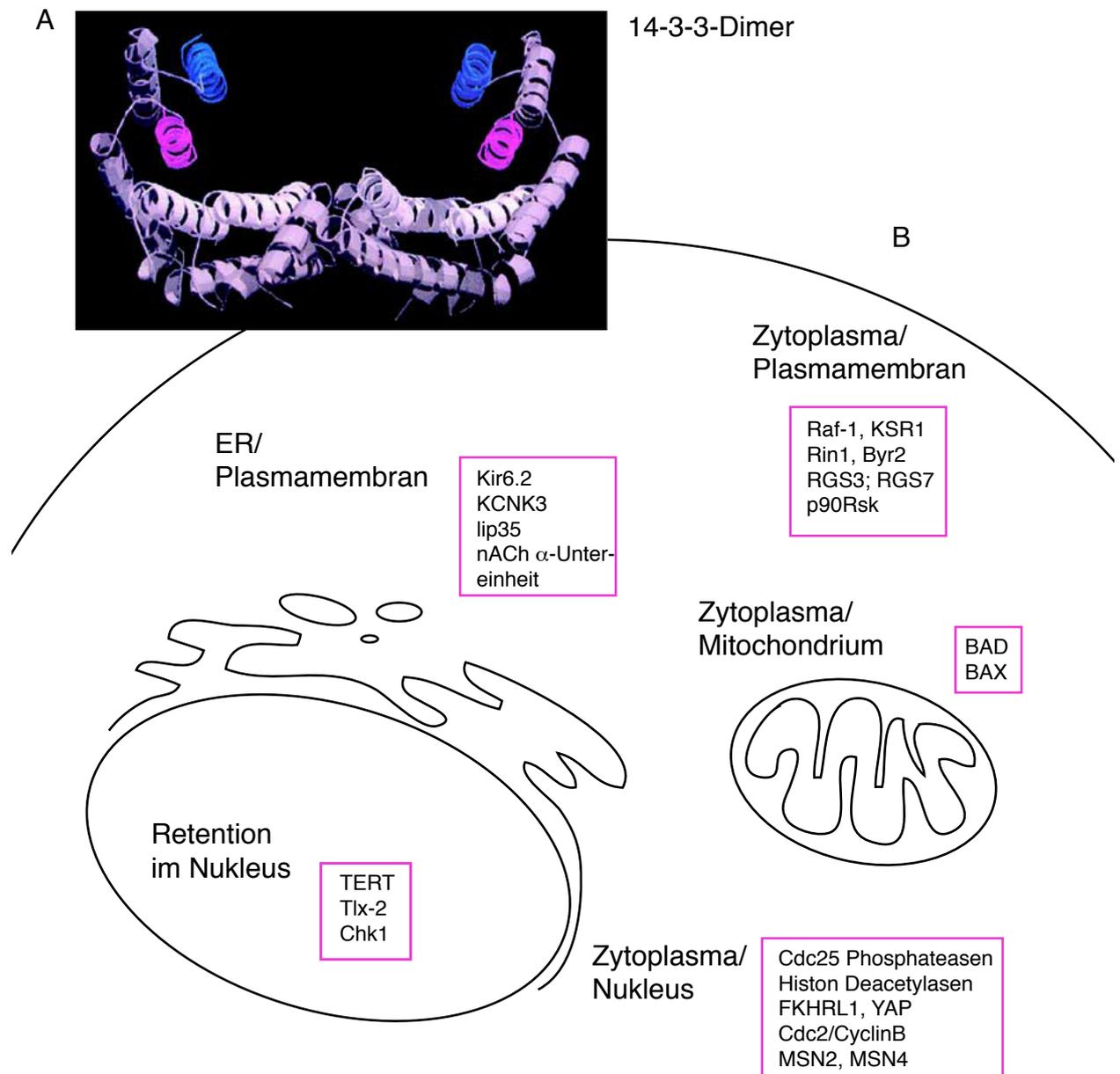
Mausmodelle mit heterozygoten oder homozygoten Deletionen ganzer  $K_{ATP}$ -Untereinheiten und Untersuchungen verschiedener Polymorphismen haben gezeigt, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle auch an der Ausbildung von Diabetes mellitus TypII beteiligt sein können (Koster et al, 2005).  $K_{ATP}$ -Kanal-Polymorphismen, (z.B. Kir6.2E23K bzw. mit SUR1 A1369S zusammen) mit anderen genetischen (z.B. den  $\beta$ -Zell-Metabolismus beeinflussenden) und Umweltfaktoren, können zu einer chronisch beeinträchtigten Funktion der  $\beta$ -Zellen führen. Die Schwierigkeit, eine direkte Verbindung zwischen der Ausbildung von Diabetes TypII und Mutationen im  $K_{ATP}$ -Kanal auszumachen, liegt nicht zuletzt in dieser polygenetischen und multifaktoriellen Aetiologie der Krankheit.

TypII-Diabetes zeichnet sich durch eine gestörte Insulinsekretion aus, wodurch ein chronisch hoher Blutzucker entsteht, der, unbehandelt, schwerwiegende Folgeschäden wie Amputationen, Herzinfarkt, Schlaganfall oder Blindheit haben kann. Viele Patienten können über einen langen Zeitraum erfolgreich mit Sulfonylharnstoffen, die über ihre Bindung an SUR1 eine Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle und damit eine Insulinsekretion ermöglichen, behandelt werden. Ein unnatürlich dauerhaft offene Kaliumkanal kann einmal aus der Unfähigkeit des Kanals, Stoffwechselprodukte zu erkennen, resultieren oder aber aus einem generell gestörten  $\beta$ -Zell-Stoffwechsel, bzw. beidem (Ashcroft und Rorsman, 2004).

Untersuchung an Kir6.2<sup>+/-</sup>, SUR<sup>+/-</sup> sowie an Kir6.2<sup>-/-</sup> und SUR<sup>-/-</sup> Mäusen haben bestätigt, dass ein partieller Verlust an  $K_{ATP}$ -Kanälen in  $\beta$ -Zellen zu einer verstärkten Glukose-Toleranz und Glukose-stimulierten Insulin-Sekretion führt, Mäuse ohne  $K_{ATP}$ -Kanäle zwar neonatal hyperinsulinämisch, aber adult höchst Glukose-intolerant und hypoinsulinämisch sind (Remedi et al, 2006). Arbeiten an isolierten menschlichen  $\beta$ -Zellinseln zeigten eine verringerte Glukose-induzierte Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle in TypII- $\beta$ -Inseln (Ashcroft, 2006).

## 1.5 14-3-3-Proteine beim Vorwärtstransport von Membranproteinen

Die Familie der hochkonservierten und ubiquitär exprimierten 14-3-3-Proteine umfasst sieben Familienmitglieder in Säugern (beta, eta, zeta, gamma, epsilon, sigma und tau), 15 in Pflanzen und jeweils zwei in Hefe, in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*. Diese kleinen, sauren, Homo- und Heterodimere-ausbildenden Proteine weisen über 300 Interaktionspartner in allen subzellulären Kompartimenten auf und modulieren deren enzymatische Aktivität, Stabilität, Lokalisation, Phosphorylierung und molekulare Interaktionen (Dougherty und Morrison, 2004). Jedes 14-3-3-Polypeptid, bestehend aus neun in fast rechtwinkliger Form angeordneten  $\alpha$ -Helices, bildet über den N-Terminus mit einem zweiten ein Sattel-förmiges Dimer mit jeweils zwei amphipathischen Liganden-Bindungstaschen (Abbildung 6 (A)) (Mackintosh, 2004). Die Ausbildung von Dimeren ist essentiell für die regulatorische Funktion dieser Proteine. Die Bindung der phosphorylierten 14-3-3-Dimere an ihre Interaktionspartner erfolgt entweder phosphorylierungsabhängig über interne (sogenannte Model- und Modell-) oder C-terminale (Modell-) Bindemotive oder phosphorylierungsunabhängig (Shikano et al, 2006; Mrowiec und Schwappach, 2006). Wie schon erwähnt, regulieren 14-3-3-Proteine zelluläre Prozesse z.B. über die Veränderung der Lokalisation von Proteinen (Abbildung 6 (B)). Dabei kann die Bindung an 14-3-3 den Transport des Bindepartners in ein bestimmtes subzelluläres Kompartiment bewirken, die Auflösung der Bindung dann wiederum eine Relokalisierung. In den meisten Fällen erfolgt die Translokation durch die Maskierung eines Transportsignals (Dougherty und Morrison, 2004). Die Maskierung durch die Bindung von 14-3-3 kann aber auch zur Blockierung der Bindung eines anderen Proteins führen. Dieser kompetitive Mechanismus wurde für eine Reihe von multimeren Proteinkomplexen der Plasmamembran beschrieben (O'Kelly et al, 2002; Yuan et al, 2003). So verhindern Arginin-haltige ER-Lokalisationssignale den Vorwärtstransport von einzelnen oder falsch zusammengelagerten Untereinheiten durch die Bindung an COPI-Proteine, die eine Zurückführung dieser „Flüchtlinge“ zum ER bewirken. Korrekt assemblierte Proteinkomplexe (im Fall von Kir6.2-Reporterproteinen) oder komplex phosphorylierte 14-3-3-Bindemotive (im Falle der invarianten Kette li35 und des KCNK3-Kanals) hingegen zeigen eine hohe 14-3-3-Affinität, durch die dem Transport an die Zelloberfläche nichts mehr im Wege steht. Dabei können die Bindestellen für COPI- bzw. 14-3-3-Proteine überlappen, nahe beieinander sein (Kuwana et al, 1998; Yuan et al, 2003; Vivithanaporn et al, 2006; Shikano et al, 2005) oder aber an entgegengesetzten Proteinenden liegen (O'Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002). Der dem 14-3-3-vermittelten Vorwärtstransport zugrunde liegende molekulare Mechanismus wird nach wie vor



**Abbildung 6: Multifunktionelle 14-3-3-Proteine.**

(A) Röntgenkristallstruktur eines 14-3-3  $\zeta$ -Dimers (aus Rittinger et al, 1999). Eine monomere Untereinheit besteht aus neun in fast rechtwinkliger Form angeordneten  $\alpha$ -Helices und bildet über den N-Terminus mit einer zweiten Untereinheit ein Sattel-förmiges Dimer mit zwei amphipatischen Liganden-Bindetaschen. (B) 14-3-3-Proteine regulieren unter anderem die Lokalisation von Proteinen in der Zelle (Zeichnung nach Dougherty und Morrison, 2004). Dargestellt sind zelluläre Komponenten sowie die Orte, zwischen denen die aufgelisteten Proteine (in rosa Kästchen) durch Interaktion mit 14-3-3-Proteinen wechseln. Die Vermittlung zwischen ER und Plasmamembran ist von besonderem Interesse für diese Arbeit.

diskutiert, wobei man im Großen und Ganzen zwischen den drei möglichen Mechanismen des „Überbrückens“ (scaffolding), „Klammerns“ (clamping) oder „Maskierens“ (masking) unterscheidet: So könnten 14-3-3-Proteine mit zwei Bindepartnern gleichzeitig interagieren und dadurch z.B. Proteine der COPII-Maschinerie oder Kinasen an Membranproteine heranführen. Oder aber 14-3-3-Proteine bewirken durch „Klammern“ eine Konformationsänderung ihrer Bindepartner, wodurch z.B. Transportsignale in eine aktive oder inaktive Form gebracht werden könnten. Die Existenz von hochaffinen und niederaffinen 14-3-3-Bindestellen in einem Protein untermauert die Überlegungen zu Konformationsänderungen, die das Protein in eine stabile Konformation überführen. Der einfachste Mechanismus ist sicher die physische Maskierung eines Transportsignals, so vorgeschlagen für den KCNK3-Kanal oder Kir6.2-Reporterproteine, deren ER-Rückführungssignal im multimeren Komplex von 14-3-3-Proteinen gebunden wird und dadurch von der Erkennung durch COPI-Komponenten abgeschirmt wird.

Es gibt bisher nur wenige Versuchsansätze, die der 14-3-3-Isoformspezifität und der differentiellen Lokalisation dieser Proteine genügend Rechnung tragen (van Zeijl, et al, 1999; Bihn, et al, 1997). Vermutlich haben Neuentdeckungen von Interaktionspartnern einen einseitigen Fokus hervorgebracht. Michelsen et al untersuchten die Rolle der 14-3-3-Isoformen BMH1 und BMH2 beim Vorwärtstransport eines Hefe-Kir6.2-Reporterproteins mit aktiven oder inaktiven Arginin-Signalen. Sie konnten zeigen, dass der Reporter in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden 14-3-3-Isoform das ER verlassen kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene 14-3-3-Isoformen unterschiedliche Aufgaben innerhalb einer Zelle erfüllen könnten.

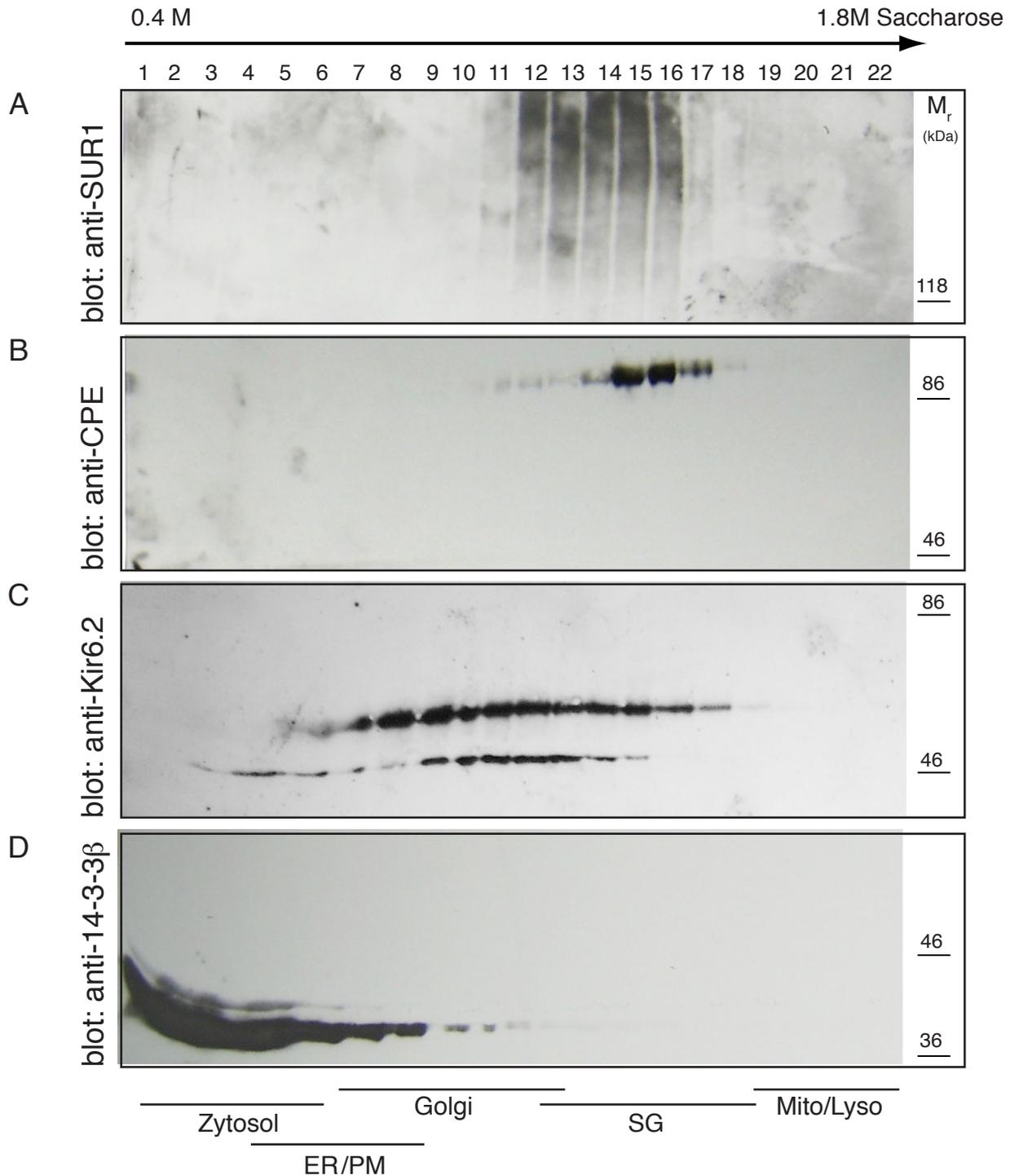
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Die Kompartimentierung der Untereinheiten von $K_{ATP}$ -Kanälen

$K_{ATP}$ -Kanäle werden aus zwei verschiedenen Proteinen gebildet: Kir6.2, ein sogenannter Einwärts-Gleichrichter- $K^+$ -Kanal, bildet die Pore des Komplexes und ist assoziiert mit SUR1, einem Sulfonyl-Harnstoff Rezeptor, Mitglied der ATP-Bindungskassette(ABC)-Transporter-Familie (Abbildung 5 (A)). Jeweils vier Untereinheiten Kir6.2 bilden mit ebenso vielen Untereinheiten SUR1 ein funktionelles Oktamer, welches, zur Plasmamembran transportiert, seiner Aufgabe als ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanal nachkommen kann (Abbildung 5 (B)). Arginin-haltige ER-Lokalisationssignale verhindern, dass die Untereinheiten alleine an die Zelloberfläche gelangen (Abbildung 5 (A)).

In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas spielen ATP-sensitive  $K^+$ -Kanäle eine wichtige Rolle als Sensoren für die Konzentration von Adenin-Nukleotiden in der Zelle und bilden einen Vermittler zwischen zellulärem Stoffwechsellzustand und elektrischer Erregbarkeit der Plasmamembran (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999). Studien an pankreatischen  $\beta$ -Inselzellen haben gezeigt, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle nicht nur in der Plasmamembran, sondern hauptsächlich in der Membran von Insulin-sezierenden Vesikeln vorkommen (Geng et al, 2003). Möglicherweise haben sie neben ihrer Funktion als ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanal an der Zelloberfläche noch andere Funktionen, z.B. als „Vernetzungs“-Protein in sekretorischen Vesikeln. So ist gezeigt worden, dass cAMP-Guanin-Nukleotid Austauschfaktor II (cAMP-GEFII) spezifisch an die Nukleotid Bindungstasche 1 (NBF1) von SUR1 bindet (Shibasaki et al, 2004). Andererseits könnten sekretorische Granula eine Art Übergangsstation für  $K_{ATP}$ -Kanäle darstellen, bevor diese zur Plasmamembran gebracht werden (Varadi et al, 2006).

Bis heute ist nicht untersucht worden, welche Faktoren in pankreatischen  $\beta$ -Zellen darüber entscheiden, in welchem Kompartiment  $K_{ATP}$ -Kanäle vorkommen und in wiefern die jeweils andere  $K_{ATP}$ -Untereinheit eine Rolle dabei spielt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, soll die Expression von Kir6.2 und SUR1 in einer pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie spezifisch reduziert werden. Die Ratten  $\beta$ -Zelllinie INS-1 zeichnet sich durch Zellen aus, deren Morphologie, Insulin-Synthese und -Sekretion in hohem Maße den Insulinomzellen ähnelt, von denen sie abstammen (Asfari et al, 1992). Die morphologischen und funktionellen Eigenschaften, zusammen mit der Tatsache, dass sie über viele Passagen hinweg ihren hohen Differenzierungsgrad aufrecht erhalten können, lässt sie adäquat erscheinen für die Untersuchung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in annähernd nativer Umgebung.



**Abbildung 7: SUR1 und Kir6.2 kofraktionieren mit Proteinen sekretorischer Granula.**

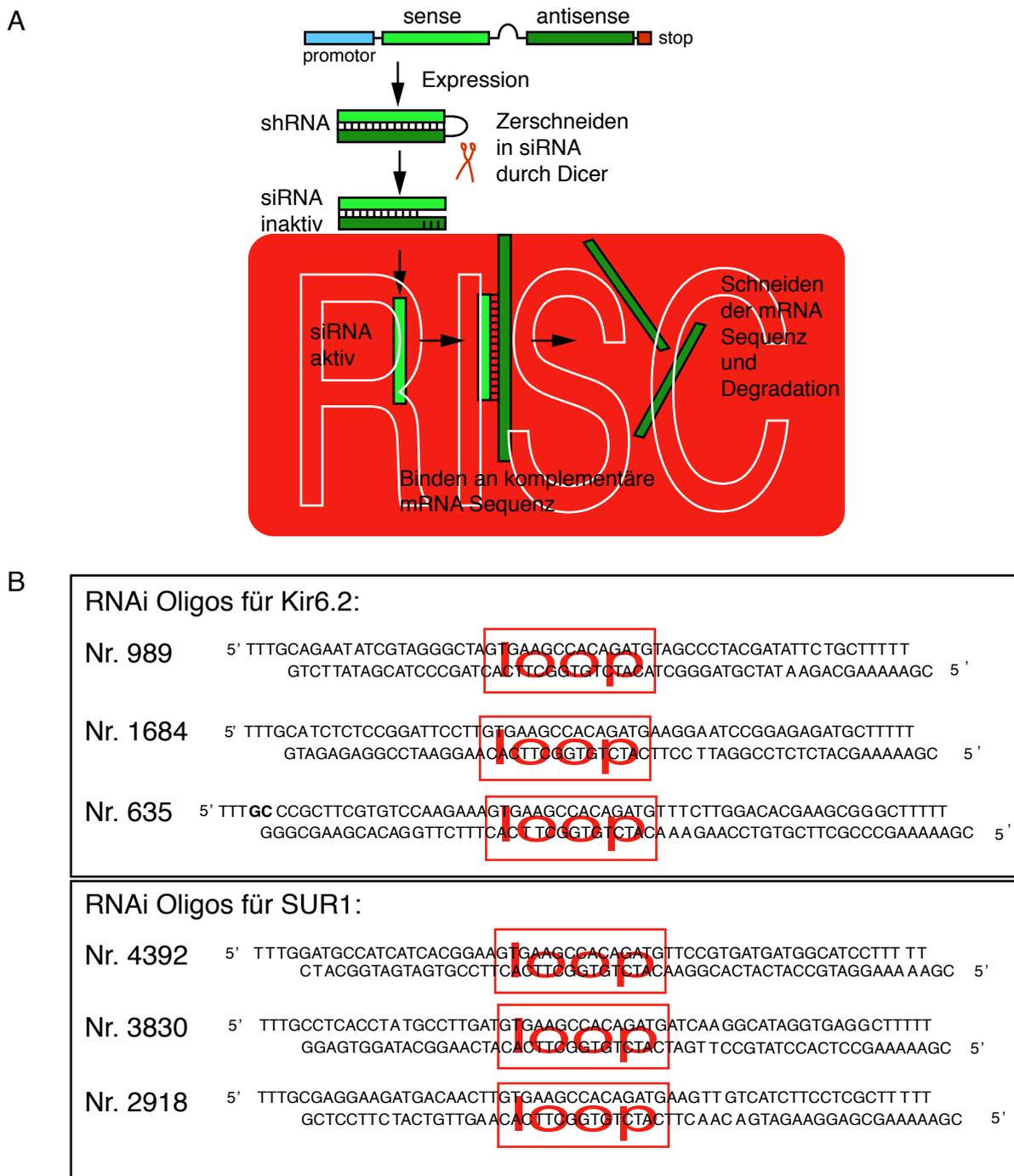
Subzelluläre Fraktionierung von  $\sim 2 \times 10^8$  INS-1-Zellen mittels linearem Saccharose-Dichte-Gradienten. Hierbei wandert jedes Organell in den Bereich des Gradienten, dessen Dichte mit der des Organells übereinstimmt (0.4-1.8M Saccharose). Aliquots jeder Fraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot analysiert. Die Blotmembranen wurden mit Antikörpern gegen SUR1, Kir6.2, das zytosolische Protein 14-3-3 $\beta$ , Carboxypeptidase E(CPE), Golgi-Matrix-Protein GM130 (nicht dargestellt) und BIP (nicht dargestellt) getestet. CPE markiert den Bereich der sekretorischen Vesikel. GM130 ist in der Golgi Matrix präsent und peripher assoziiert mit dem *cis*-Golgi Kompartiment. BIP ist ein Hitzeschock-Protein-70(Hsp70)-Chaperon und kennzeichnet den luminalen Bereich des endoplasmatischen Retikulums. Weitere Angaben über die Verteilung der verschiedenen Zellorganellen in den Fraktionen (PM/Mito/Lyso) orientieren sich an Erfahrungswerten (aus der Literatur).

### 2.1.1 Subzelluläre Verteilung der $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten SUR1 und Kir6.2 in der $\beta$ -Zelllinie INS-1

Um die subzelluläre Verteilung von endogenem Kir6.2 und SUR1 zu untersuchen, wurden ca.  $2 \times 10^8$  INS-1-Zellen nach Aufschluss im Balch-Homogenisator über einen kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (0.4-2M) fraktioniert. 22 Fraktionen wurden gesammelt, über SDS-PAGE (10% + 7%) aufgetrennt und geblottet (Abbildung 7). Im Western-Blot wurden die Membranen zuerst mit Antikörpern gegen SUR1 (A) und Kir6.2 (C) detektiert, in einer zweiten Runde gegen das Golgi Matrix Protein GM130 (nicht gezeigt) und die cytosolischen 14-3-3 Proteine (D), gefolgt vom Marker des luminalen ER Hsp70 Chaperon BIP (nicht gezeigt) und CPE (B). Carboxypeptidase E (CPE, (B)) markiert die für pankreatische  $\beta$ -Zellen typischen Insulin sezernierenden Granula (SG). Die Kofraktionierung von SUR1 (A) in diesem Bereich belegt die für SUR1 typische breit verteilte Immunreaktivität im Bereich von Proteinen mit einem Molekulargewicht ab ca. 130 kDa. Diese Immunreaktivität spiegelt vermutlich heterogen glykosylierte Formen von SUR1 wider. SUR1 ist weiterhin mit Fraktionen des Golgi assoziiert (siehe eingezeichnete Organell-Markerverteilung). Kir6.2 (C) ist ebenfalls in der Fraktion der sekretorischen Vesikel angesiedelt, ein großer Teil jedoch überlappt auch mit der Golgi/ER-Fraktion (siehe eingezeichnete Organell-Markerverteilung). Ein ähnliches Fraktionierungsmuster ergab eine Untersuchung der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten in der Maus  $\beta$ -Zelllinie MIN6 (Varadi et al, 2006). 14-3-3-Proteine kofraktionieren mit Kir6.2 in der ER/Plasmamembran Fraktion (siehe eingezeichnete Organell-Markerverteilung).

### 2.1.2 Mechanismus der Interferenz-RNA und Design von shRNA-Sequenzen

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Kompartimentzugehörigkeit der  $K_{ATP}$ -Untereinheiten in Abhängigkeit von der jeweiligen Partner-Untereinheit wurde die RNA-Interferenz- (RNAi) Methode zur spezifischen Verringerung der Expression eines Zielproteins gewählt (Abbildung 8 (A)). Das Einbringen von Doppelstrang-RNA in eukaryotische Zellen führt zu einer posttranskriptionellen Zerstörung der mRNA homolog zur Doppelstrang-RNA. Dieser RNAi-Effekt wurde zum ersten Mal in *C.elegans* beschrieben (Fire et al, 1998). Man vermutet dahinter eine Art Verteidigungsmechanismus der Zelle gegenüber genetischem Fremdmaterial. In diesem Prozess schneidet eine RNase III Namens Dicer lange Doppelstrang-RNA in kurze Interferenz RNA – short interfering RNA (siRNA) – von einer Länge von ca. 21 Nukleotiden (Hammond et al, 2000). siRNA Doppelstränge werden in den „RNA-induzierten Silencing-



**Abbildung 8: Wirkungsweise und Sequenzen von small hairpin RNA (shRNA).** (A) Schematische Darstellung des „small hairpin RNA“-vermittelten RNA-Interferenz-Mechanismus. Die kurze (< 30 Nukleotide) Sequenz des „Sense“ und „Antisense“-Stranges ist über eine sogenannte „loop“-Sequenz getrennt, so dass sich in der transkribierten RNA die „Sense“-Region spontan zurückfaltet, mit der „Antisense“-Region hybridisiert und somit eine „small-hairpin RNA“ entsteht. Diese shRNA wird von der RNase Dicer in kleine Stücke, sogenannte „small interference RNAs“(siRNAs) geschnitten und dann in den „RNA inducing silencing complex“ (RISC) eingeschleust. Die zwei RNA-Stränge werden separiert und binden nun an die homologe Region auf der zellulären mRNA. Die mRNA wird daraufhin in den homologen Regionen geschnitten und anschließend degradiert. (B) shRNA-Sequenzen für Kir6.2 und SUR1. Mit Hilfe eines siRNA Design-Programms von Invitrogen ([www.rnadesigner.invitrogen.com](http://www.rnadesigner.invitrogen.com)) wurden jeweils drei 19-21 Nukleotide lange Oligos ermittelt, die homolog zu einem codierenden Sequenzbereich des Zielgens sind. Auf der Basis dieser siRNA wurde eine shRNA-Sequenzabfolge erstellt: „Sense“- und „Antisense“- Sequenz wurden durch eine 15 Basenpaar lange „Loop“-Sequenz getrennt, die das Zurückfalten der transkribierten RNA ermöglicht.

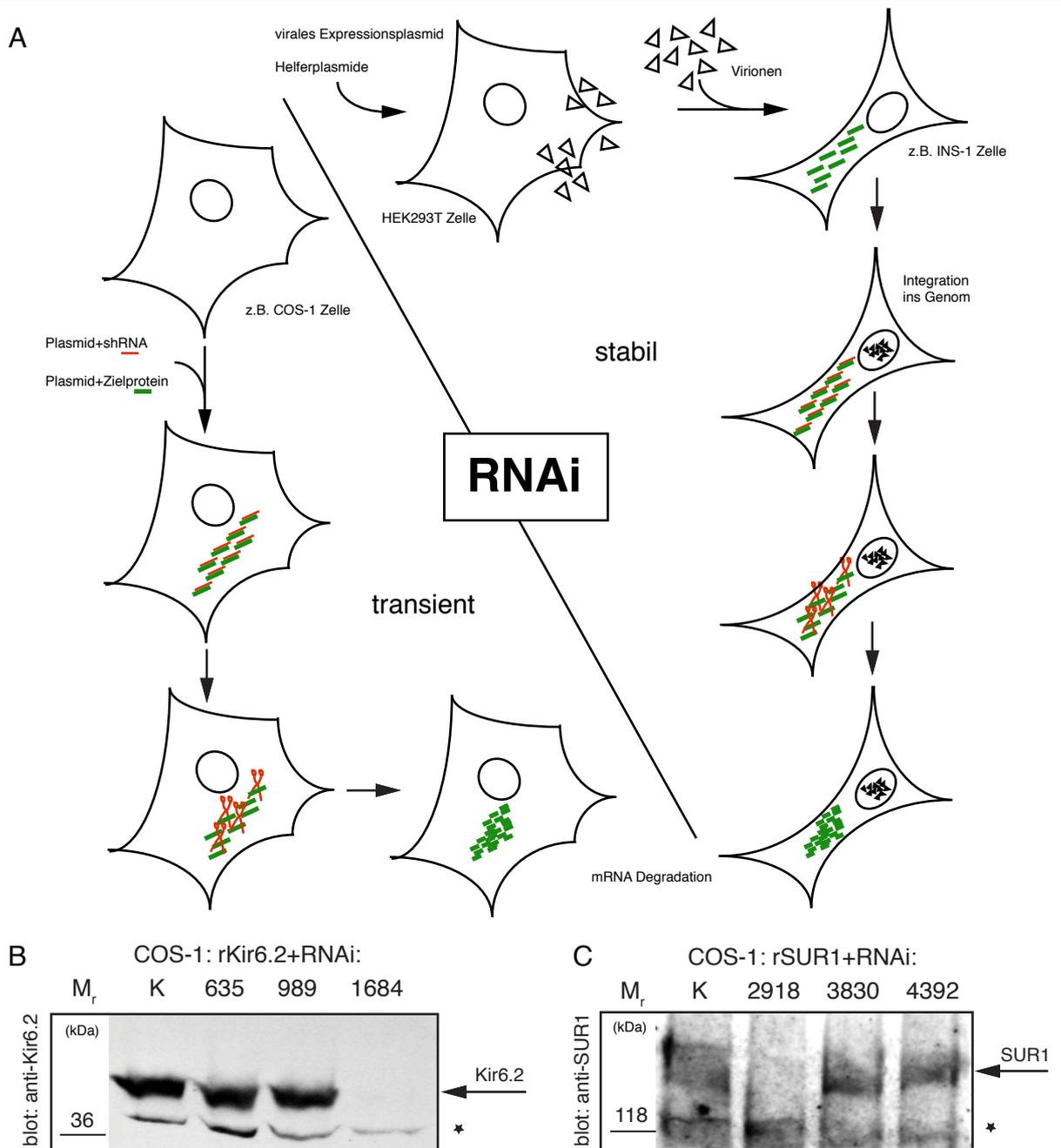
Komplex“ (RISC) inkorporiert, der den Doppelstrang aufwindet, separiert und nach Heranführen der siRNA an die homologe mRNA letztere schneidet und somit für die Degradation bestimmt (Martinez et al, 2002).

Eine Möglichkeit, siRNA-Effekte in der Zelle zu erzielen, besteht in der Expression eines einzelnen Transkriptes (Abbildung 8 (A)), welches die Sequenz des „Sense“-Stranges (homolog zum kodierenden Strang) und die des „Antisense“-Stranges (homolog zum nicht-kodierenden Strang), getrennt von einer „Loop“-Sequenz (aus der microRNA30) enthält. In der transkribierten RNA faltet sich der Sense-Strang spontan zurück und verbindet sich mit dem Antisense-Strang, es wird eine kleine Haarnadel RNA - small hairpin RNA (shRNA) - gebildet, die wie oben beschrieben von Dicer und RISC prozessiert wird.

Mit Hilfe eines siRNA-Design-Programmes von Invitrogen ([www.rnadesigner.invitrogen.com](http://www.rnadesigner.invitrogen.com)) wurden für jede  $K_{ATP}$ -Untereinheit jeweils drei 19-21 Nukleotide lange Oligos ermittelt, die homolog zu einem codierenden Sequenzbereich des Zielgenes sind (Abbildung 8 (B)). Kurze Nukleotide haben den Vorteil, dass man unerwünschte Effekte wie Interferon-Anwort und Apoptose ausschließen kann. Auf der Basis der Oligosequenz wurde eine shRNA Sequenzabfolge erstellt: „Sense“- und „Antisense“-Sequenz wurden durch eine 15 Nukleotide lange Schleife (loop) getrennt. Diese Loop-Sequenz stammt von dem Vorläufer der nicht-kodierenden microRNA 30 (Zeug et al, 2002) und ermöglicht das Zurückfalten der transkribierten RNA, so dass die Stränge hybridisieren. Fünf Thymidine am 3'Ende ermöglichen dem Polymerase-III-Promotor das Transkript zu beenden und einen Zwei-T-Überhang zu produzieren, welcher für die funktionelle siRNA entscheidend ist (Elbasmir et al, 2001). Die Nummern der shRNA Sequenzen beschreiben den Bereich der Ziel-mRNA.

#### **2.1.2.1 Reduktion der Expression von Kir6.2 und SUR1 durch siRNA in COS-1-Zellen**

Um die Wirkungsweise der ausgewählten siRNA zu testen, wurden synthetisierte Einzelstrang-Oligonukleotide hybridisiert und in den Säugerexpressionsvektor pBudCE4.1-U6 (Dittgen et al, 2004) kloniert. Der Polymerase III Promotor U6 treibt die Expression der shRNA an. Für eine transiente Testexpression (siehe auch Abbildung 9 (A) links) wurden COS-1- (*Cercopithecus aethiopsis*) Zellen mit einem Expressionsplasmid, kodierend für rKir6.2 (Abbildung 9 (B)) oder rSUR1 (Abbildung 9 (C)) zusammen mit je einem der verzeichneten shRNA-Expressionsplasmide transfiziert (DNA Verhältnis 1:1). Als Kontrollplasmid diente der Vektor pBudCE4.1-U6 ohne shRNA. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, Zellfragmente und Kerne pelletiert und die Lysate über SDS-PAGE (10%+7%) aufgetrennt. Der anschließende Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen Kir6.2 (B) oder gegen SUR1 (B)



**Abbildung 9: siRNA reduziert die Expression von Kir6.2 und SUR1 Proteinen.**

(A) Schematische Darstellung der Einschleusung von RNAi-Plasmiden in Säugerzellen für transiente und stabile Expression. Synthetisierte Einzelstrang-Oligonukleotide werden hybridisiert und in einen Expressionsvektor eingefügt. Dieser Expressionsvektor kann für transiente Transfektion (linker Teil der Abbildung) verwendet werden oder als „Shuttle“-Vektor dienen: Die shRNA-Sequenz kann zusammen mit dem U6 Promotor in ein lentivirales Expressionsplasmid inkloniert werden. Im Falle der transienten Expression wird die rekombinante DNA und die shRNA auf Plasmiden in die Zellen gebracht (z.B. COS-1) und anschließend das Expressionslevel des Proteins untersucht (z.B. SDS-PAGE und Western Blot). Längeranhaltende RNAi-Effekte kann man über stabile Integration der shRNA-Sequenz ins Genom der Zielzellen erlangen, z.B. über lentivirale Transduktion (rechter Teil der Abbildung). In diesem System produzieren transfizierte Verpackungszellen (HEK293T) die shRNA-enthaltenden Virionen. Mit den viralen Partikel werden Zielzellen transduziert. Die Integration kann mittels Markerproteinen überprüft werden.

(B) + (C) In COS-1 Zellen wurden Plasmide mit verschiedenen shRNA-Sequenzen und dem Plasmid, das für rKir6.2 (B) oder rSUR1 (C) codiert, cotransfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und pelletiert. 30% der Lysate wurden über 10% (B) bzw. 7% (C) SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Proteine auf dem Western-Blot mit einem Antikörper gegen Kir6.2 (B) oder SUR1 (C) detektiert. Kreuzreaktive Banden sind mit einem Stern gekennzeichnet und zeigen die ähnliche Beladung der Spuren mit Protein an. K, Kontrollplasmid, enthält nur den U6-Promotor.

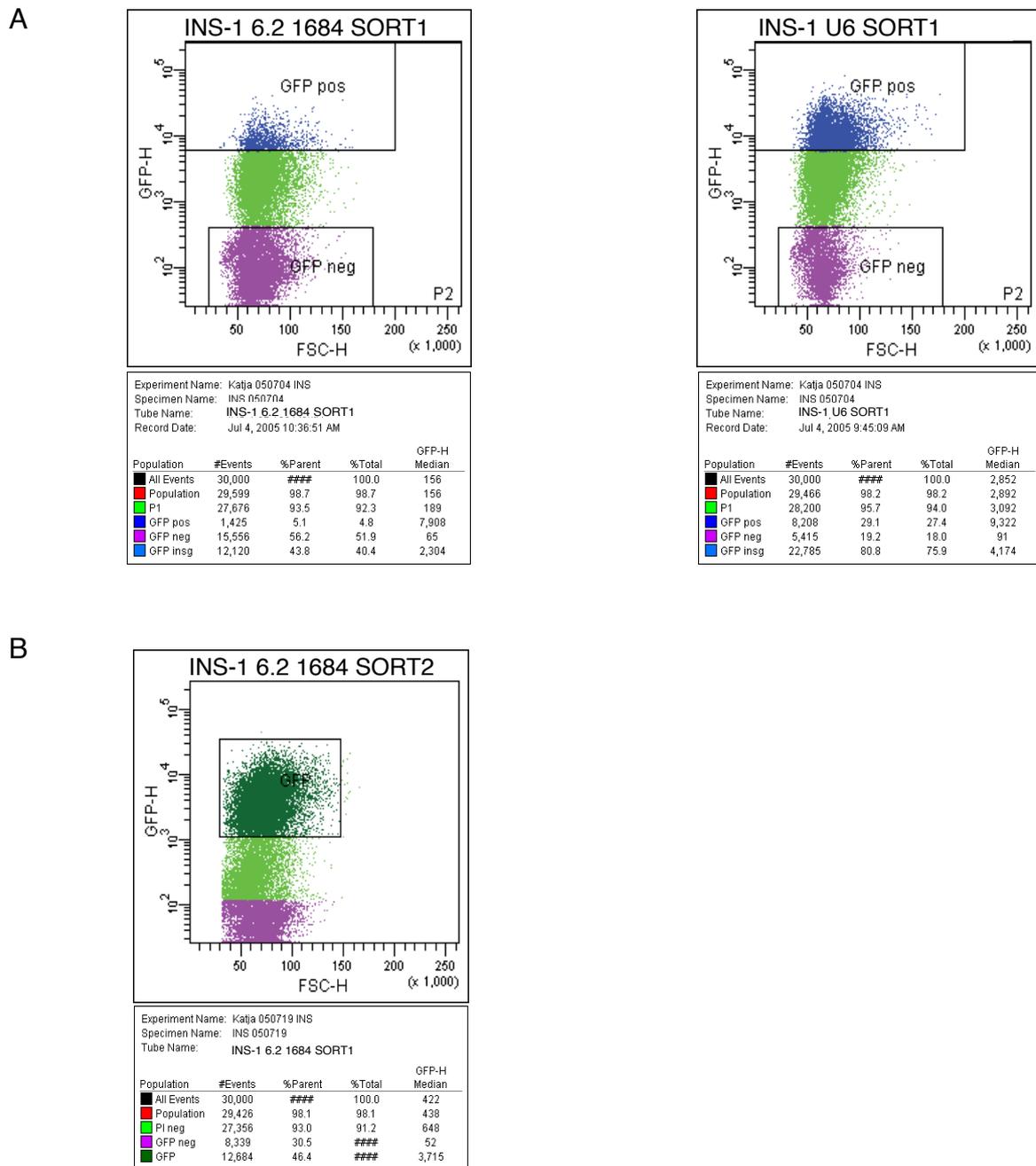
detektiert. In COS-1-Zellen reduziert shRNA Nr.1684 effektiv die Expression von rKir6.2 und shRNA Nr.2918 die Expression von rSUR1.

### 2.1.3 Herstellung stabiler RNAi-Zelllinien

Da sich die  $\beta$ -Zelllinie INS-1 sehr schlecht transfizieren lässt, wurde die Methode der viralen Transduktion gewählt. Hierbei werden Verpackungszellen (z.B. HEK293T) mit entsprechenden viralen Expressions- und Helferplasmiden transfiziert, die produzierten Virionen gesammelt und gereinigt und die Zielzellen damit transduziert (siehe Abbildung 9 (A) rechts). Das virale Expressionssystem der Wahl basiert auf dem Lentivirus HIV-1, einem Mitglied der Retroviren Familie. Das Einzelstrang-RNA Genom des Virus wird in der Zelle revers transkribiert zu DNA, die dann stabil ins Genom der Zielzellen integrieren kann. Zelluläre Verteidigungsmechanismen können dadurch so gut wie ausgeschlossen werden. Der Vorteil der Lentiviren besteht in der Fähigkeit auch die Zellen zu transduzieren, die sich gerade nicht teilen (Wang et al, 2000). In das lentivirale Expressionsplasmid FUGWlinker (Dittgen et al, 2004), welches für GFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors-C kodiert, wurde die ausgewählte shRNA zusammen mit dem U6-Promotor in einen Linker-Bereich kloniert. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr.Pawel Osten (MPI für experimentelle Medizin, Heidelberg) wurde in drei verschiedenen Ansätzen INS-1-Zellen mit den von Verpackungszellen HEK293T produzierten Virionen transduziert. Die viralen Partikel enthielten einmal das Expressionsplasmid mit der shRNA Nr.1684, einmal mit shRNA Nr.2918 und einmal nur den U6-Promotor als Kontrollplasmid. Nach sechs Tagen wurden die Zellen trypsiniert und in einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS) analysiert und sortiert.

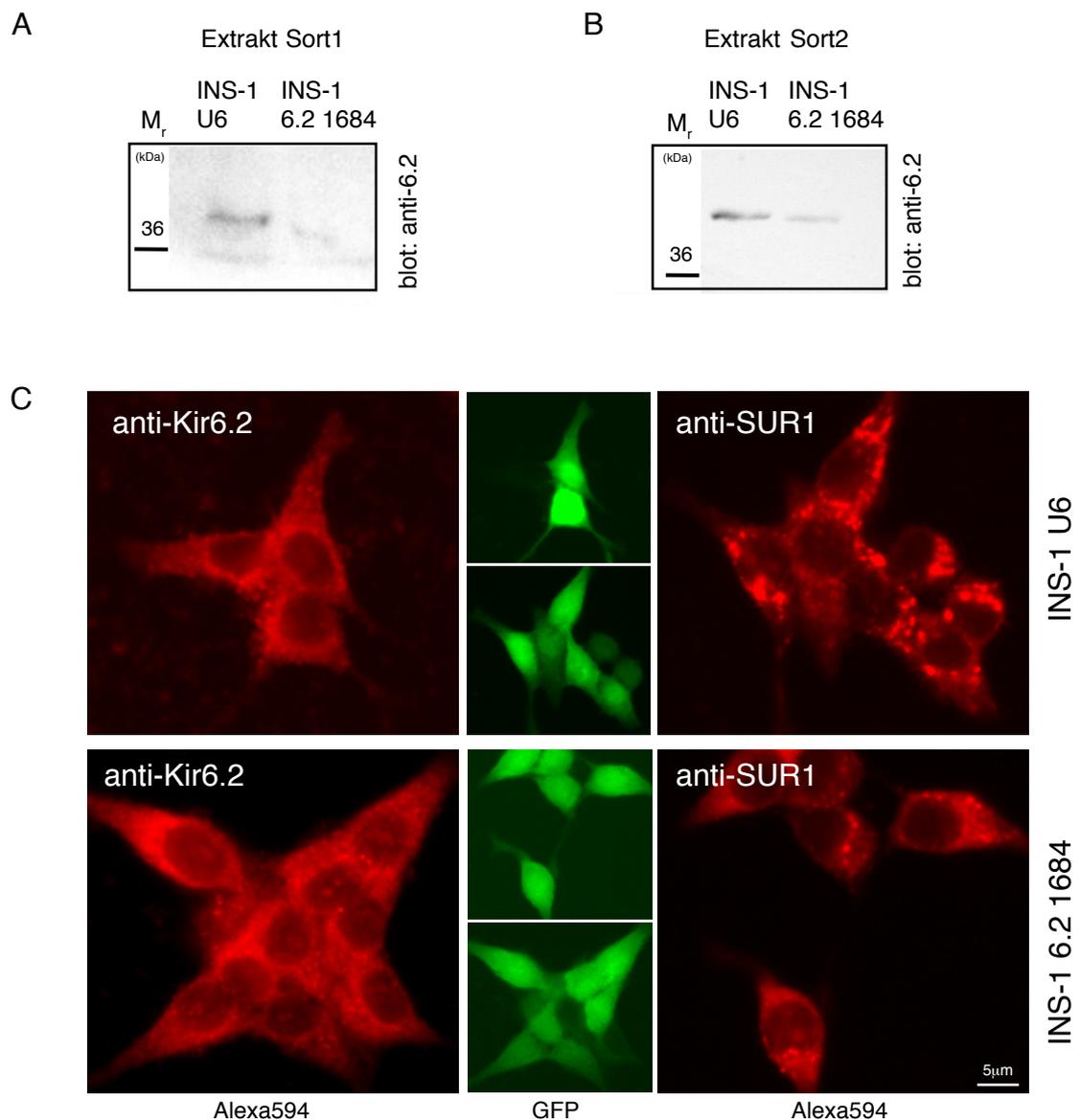
#### 2.1.3.1 Stabile Integration von Kir6.2 shRNA Nr.1684 in $\beta$ -Zellen

Die Dot-Blots in Abbildung 10 zeigen die Intensität der GFP-Fluoreszenz aufgetragen gegen die Zellgröße (bestimmt durch den forward scatter FSC-H). Die Transduktionseffizienz, ermittelt über die GFP-Fluoreszenz, lag für die Zellen INS-1-6.2-1684 bei 40% (Abbildung 10 (A) links), für die Kontrollzellen INS-1-U6 bei 75% (A, rechts). Es wurden Zellen sortiert, die eine hohe GFP-Intensität aufwiesen (Sortierfenster GFP-pos). Die einmal sortierten Zelllinien wurden eine Woche kultiviert und dann einer zweiten Sortierunde unterzogen. Wie beim ersten Mal wurden Zellen mit hoher GFP-Fluoreszenz sortiert (Abbildung 10 (B)).



**Abbildung 10: Stabile Integration von Kir6.2-shRNA-1684 in INS-1-Zellen.**

FACS-Sortierung von stark GFP-positiven Zellen. Die Dot Plots zeigen die Intensität der GFP-Fluoreszenz auf der Y-Achse und den sogenannten „forward scatter“ auf der X-Achse, welcher die Größe der Zellen beschreibt. Es wurden solche Zellen sortiert, die im Fenster „GFP positiv“ lagen. (A) a: Für die Transduktion von INS-1-Zellen wurde die zuvor transient getestete shRNA-Variante 1684 zusammen mit dem U6-Promotor in einen lentiviralen Expressionsvektor (Dittgen et al, 2004) kloniert, welcher als Markerprotein GFP unter Kontrolle eines Ubiquitin C-Promotors enthält. INS-1-Zellen wurden mit den von HEK293T hergestellten und gereinigten Virionen transduziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen analysiert und solche mit hoher GFP-Fluoreszenz in einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS) sortiert. b: Kontrollzellen wurden mit Lentivirionen transduziert, die nur den U6-Promotor (ohne shRNA) enthielten. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der GFP-Fluoreszenz ermittelt. (B) Die einmal sortierten INS-1-6.2-1684-Zellen wurden eine Woche kultiviert und einer zweiten Sortierungsrunde unterzogen. Wie beim ersten Mal wurden Zellen mit hoher GFP-Fluoreszenz sortiert.



**Abbildung 11: Stabil integrierte shRNA reduziert Kir6.2-Expression in INS-1-6.2-1684-Zellen.**

(A) + (B) Western-Blot von sortierten INS-1-6.2-1684 und INS-1-U6-Zellen. Mit dem FACS wurden jeweils  $10^6$  stark GFP-positive Zellen (Sort 1 (A), Sort 2(B)) abgelegt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgelöst, lysiert und Zelllysate gleicher Proteinmenge über SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Die Western-Blot-Membran wurde mit einem Antikörper gegen Kir6.2 detektiert. (C) Immunfluoreszenz von sortierten INS-1-6.2-1684-Zellen (untere Reihe) und Kontrollzellen (obere Reihe). Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Kir6.2 (links) bzw. gegen SUR1 (rechts) inkubiert. Alexa-Fluor-594-gekoppelte Zweitantikörper ermöglichten die Detektion der Proteine im roten Bereich. Die GFP-Fluoreszenz der Zellen belegt die lentivirale Integration.

### 2.1.3.2 Stabil integrierte shRNA reduziert die Expression von Kir6.2 in $\beta$ -Zellen

Um die Wirkungsweise der siRNA auf endogenes Kir6.2 Protein zu untersuchen, wurden von jeder Zelllinie wurden ca.  $10^6$  stark GFP-positive Zellen aus Sort 1 und Sort 2 für eine Western-Blot-Analyse abgelegt. Die Gesamtproteinmenge in den Zellysaten wurde über Bradford bestimmt und gleiche Proteinmengen über SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem Antikörper gegen Kir6.2 (Abbildung 11 (A) und (B)). Die Menge an endogenem Kir6.2 ist in der Zelllinie INS-1-6.2-1684 deutlich geringer als die in den Kontrollzellen.

### 2.1.3.3 Immunfluoreszenz der stabilen Zelllinien INS-1-6.2-1684 und INS-1-U6

Nachdem Western-Blot-Analysen gezeigt haben, dass stabil integrierte shRNA Nr.1684 eine Herabregulierung von endogenem Kir6.2 Protein bewirkt, wurden Zellen der ersten Sortierungsrunde fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Kir6.2 (Abbildung 11 (C) links) oder gegen SUR1 (Abbildung 11 (C) rechts) gefärbt. Ein Fluoreszenz-gekoppelter (Alexa-594) Zweitantikörper erlaubte die mikroskopische Analyse der Zellen im roten Bereich. Die GFP-Fluoreszenz (mittlere Bilder, verkleinert) belegt die stabile Integration der lentiviralen Konstrukte. In der oberen Reihe sind Zellen der Linie U6, in der unteren Zellen der Linie 6.2-1684 abgebildet. Die Proteinfärbungen zeigen für beide  $K_{ATP}$ -Untereinheiten eine Verteilung in Punkten innerhalb der gesamten Zelle, den Nukleus ausgenommen, wobei die SUR1-Punkte clusterartig erscheinen. Wie schon anhand der subzellulären Fraktionierung gesehen, sind die  $K_{ATP}$ -Untereinheiten hauptsächlich intrazellulär in (Vesikelcluster-artigen) Punkten lokalisiert und kaum an der Plasmamembran auszumachen. Vergleicht man die Kontrollzellen mit 6.2-1684, erscheint das Verteilungsmuster der Kir6.2-Punkte gleich, die Anzahl der SUR1-Cluster hingegen verringert in den 6.2-1684-Zellen.

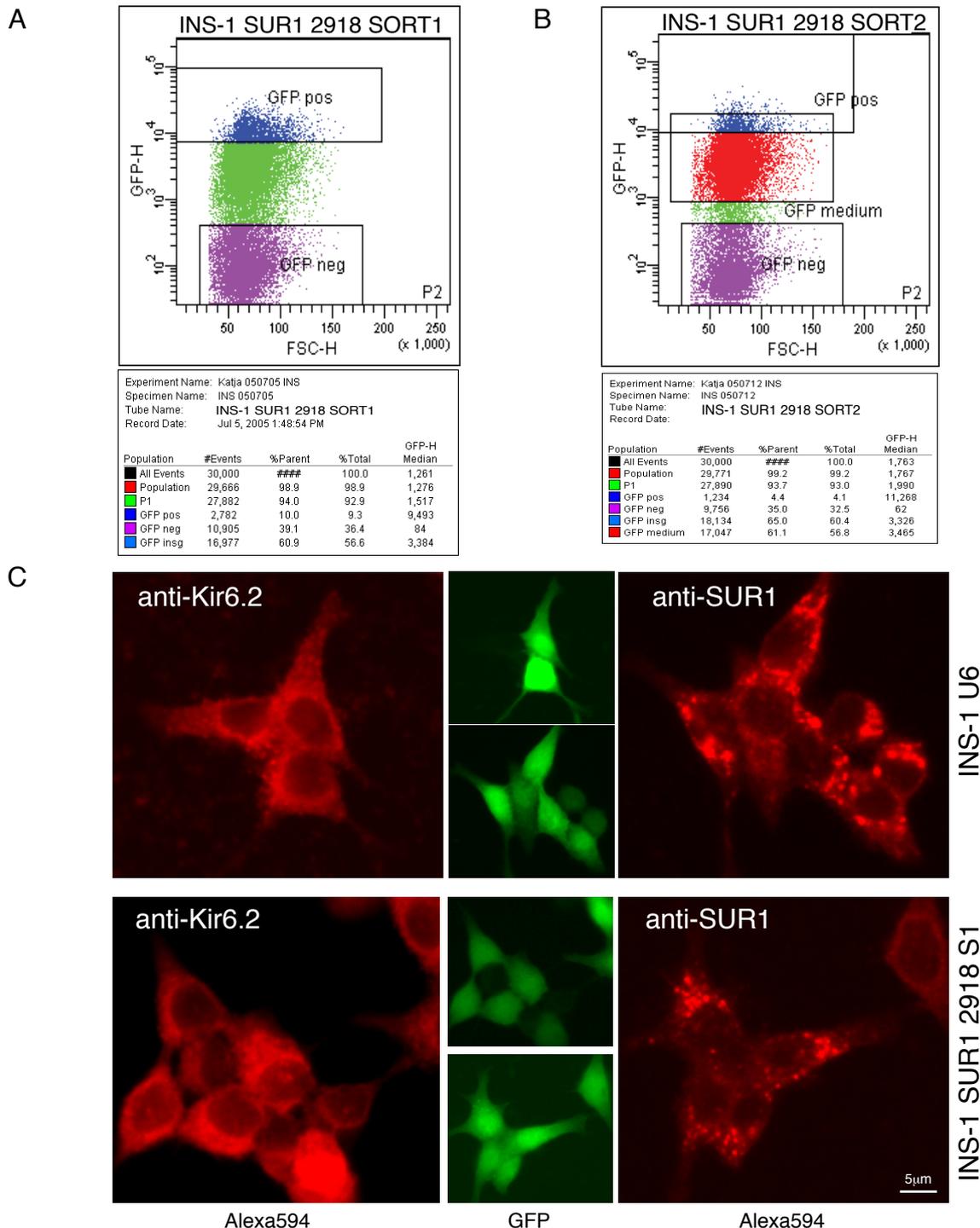
### 2.1.3.4 Stabile Integration von SUR1 shRNA Nr.2918 in $\beta$ -Zellen

Wie schon oben erwähnt wurden INS-1-Zellen auch mit der gegen SUR1 gerichteten shRNA 2918 transduziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen trypsiniert und in einem Fluoreszenz aktivierten Zellsortierer (FACS) analysiert und sortiert. Die Dot-Blots in Abbildung 12 (A) und (B) zeigen die GFP-Intensität der Zellen aufgetragen gegen die Zellgröße (bestimmt durch den forward scatter FSC-H). Die Transduktionseffizienz, ermittelt über die GFP-Fluoreszenz, lag für die Zellen INS-1-SUR1-2918 bei 56% (Abbildung 12 (A)). Es wurden Zellen sortiert, die eine hohe GFP-Fluoreszenz aufwiesen (Sortierfenster GFP-pos). Die einmal sortierte Zelllinie wurde

eine Woche kultiviert und dann einer zweiten Sortierungsrunde unterzogen. Wie beim ersten Mal wurden Zellen mit hoher GFP-Fluoreszenz sortiert (Abbildung 12 (B)).

#### **2.1.3.5 Immunfluoreszenz der stabilen Zelllinien INS-1-SUR1-2918 und INS-1-U6**

Da eine Western-Blot-Analyse der Zelllinie INS-1-SUR1-2918 keine eindeutigen Schlüsse über die Wirkung der stabil integrierten shRNA 2918 auf die Expression von endogenem SUR1 erlaubte, wurden die einmal sortierten Zellen sowie die Kontrollzellen INS-1-U6 fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Kir6.2 (Abbildung 12 ((C) links) oder gegen SUR1 (Abbildung 12 (C) rechts) gefärbt, um zu sehen, ob eine möglicherweise veränderte Lokalisation Aufschluss über eine shRNA-Wirkung geben kann. Ein Fluoreszenz-gekoppelter (Alexa-594) Zweitantikörper erlaubte die mikroskopische Analyse der Zellen im roten Bereich. Die GFP-Fluoreszenz (mittlere Bilder, verkleinert) belegt die stabile Integration der lentiviralen Konstrukte. In der oberen Reihe sind Zellen der Linie U6, in der unteren Zellen der Linie SUR1-2918 abgebildet. Die Färbungen zeigen ein ähnliches Proteinverteilungsmuster wie die Färbungen der Zelllinie INS-1-6.2-1684, nämlich die punktartige Verteilung beider  $K_{ATP}$ -Untereinheiten über das gesamte Zellsoma, den Nukleus ausgenommen. SUR1 erscheint in größeren Punkten (Cluster) als Kir6.2. Vergleicht man die Kontrollzellen mit SUR1-2918, erscheint das Verteilungsmuster der Kir6.2-Punkte gleich, die Anzahl der SUR1-Cluster hingegen verringert in den SUR1-2918-Zellen.



**Abbildung 12: Stabile Integration von SUR1-shRNA-2918 in INS-1-Zellen.**

(A) und (B) FACS-Sortierung von stark GFP-positiven Zellen. Die Dot-Blots zeigen die Intensität der GFP-Fluoreszenz auf der Y-Achse und den sogenannten „forward scatter“ auf der X-Achse, welcher die Größe der Zellen beschreibt. Zellen im Fenster „GFP positiv“ wurden sortiert. (A) Für die Transduktion von INS-1-Zellen wurde die zuvor transient getestete shRNA Variante 2918 zusammen mit dem U6-Promotor in einen lentiviralen Expressionsvektor kloniert, welcher als Markerprotein GFP unter Kontrolle eines Ubiquitin-C-Promotors enthält. INS-1-Zellen wurden mit den von HEK293T hergestellten und gereinigten Virionen transduziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen analysiert und solche mit hoher GFP-Fluoreszenz in einem Fluoreszenz aktivierten Zellsortierer (FACS) sortiert. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der GFP-Fluoreszenz ermittelt. (B) Die einmal sortierten INS-1-SUR1-2918-Zellen wurden eine Woche kultiviert und einer zweiten Sortierungsrunde unterzogen. Wie beim ersten Mal wurden Zellen mit hoher GFP-Fluoreszenz sortiert. (C) Immunfluoreszenz von sortierten INS-1-SUR1-2918-Zellen (untere Reihe) und Kontrollzellen (obere Reihe). Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Kir6.2 (links) bzw. gegen SUR1 (rechts) inkubiert. Alexa-Fluor-594-Zweitantikörper ermöglichten die Detektion der Proteine im roten Bereich. Die GFP-Fluoreszenz der Zellen belegt die lentivirale Integration.

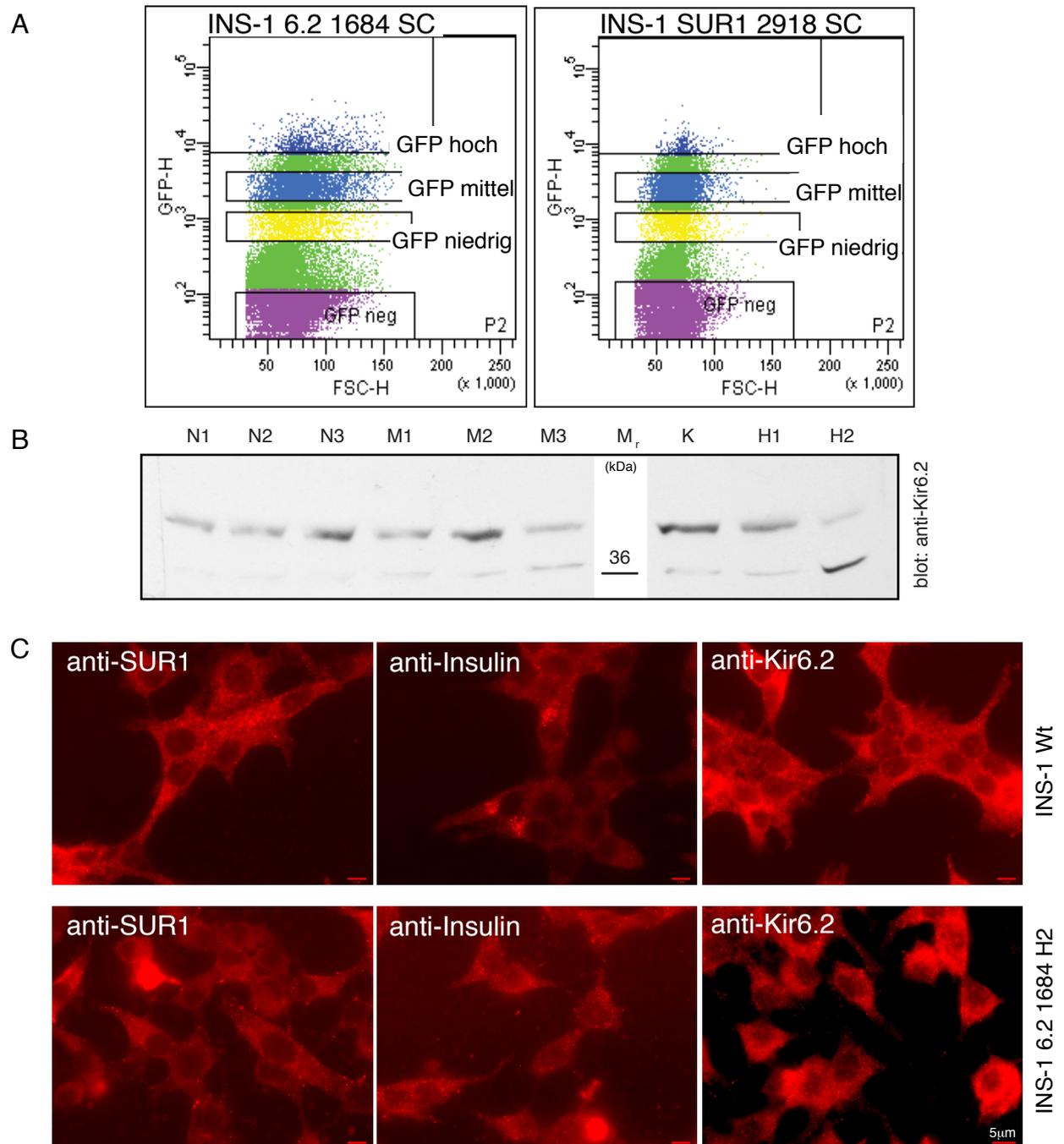
### 2.1.3.6 Kultivierung der transduzierten $\beta$ -Zelllinien über einen längeren Zeitraum

Die Zellen der  $\beta$ -Zelllinie INS-1 proliferieren sehr langsam, die Verdoppelung der Population benötigt ca. 100 Stunden (Asfari et al, 1992). Für viele biochemische Analyseansätze benötigt man große Mengen Zellmaterial (z.B. für einen Saccharosegradienten ca.  $2 \times 10^8$  Zellen), was die Kultivierung und Passagen über einen längeren Zeitraum mit sich bringt. Western-Blot-Analysen der Zelllinie INS-1-6.2-1684 nach mehreren Passagen ergaben eine Verringerung des siRNA Effektes auf natives Kir6.2 (nicht gezeigt). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen belegten außerdem eine deutlich verringerte Fluoreszenz des Reporterroteins GFP (nicht gezeigt).

### 2.1.3.7 Analyse von homogenen Zellpopulationen transduzierter INS-1-Zellen mit verschieden starker Expression des Reporterproteins GFP

Da die Möglichkeit besteht, dass die viralen Transkripte mehrfach in die  $\beta$ -Zellen integriert haben, und die Streuung der GFP-Fluoreszenz der transduzierten Zellen dadurch zu erklären sein könnte, wurden zur Herstellung von homogenen Zellpopulationen von jeder der beiden zuvor noch nicht sortierten Zelllinien INS-1-6.2-1684 und INS-1-SUR1-2918 mit Hilfe des FACS Einzelklone aus jedem GFP-Intensitätsbereich (hoch, mittel, niedrig) in 96-Loch Platten sortiert (Abbildung 13 (A)). Nachdem sich die Einzelklone über einen Zeitraum von mehreren Monaten zu einer Population von ca.  $10^7$  entwickelt hatten, wurden  $10^6$  INS-1-6.21684 Zellen für Western-Blot-Analysen verwendet (Abbildung 13 (B)). Zelllysate von drei Zelllinien mit ursprünglich niedriger und mittlerer GFP-Fluoreszenz sowie von zwei Zelllinien mit ursprünglich hoher GFP-Fluoreszenz wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion mit einem Antikörper gegen Kir6.2 zeigte die „Knock-Down-Effekte“ in diesen Zellen. Zelllinie INS-1-6.21684-H2 (für hohe GFP-Fluoreszenz) zeigt eine deutlich reduzierte Expression von endogenem Kir6.2 im Vergleich zu den Kontrollzellen INS-1-U6. Die Zellen der 6.2-1684-H2 Linie wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Kir6.2 (Abbildung 13 (C), rechts unten), SUR1 (C, links unten) und Insulin (C, Mitte unten) gefärbt. Alexa549-Zweitantikörper ermöglichten die fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Bei der Kontrolle der GFP-Fluoreszenz zeigte sich, dass bei der Zellpopulation des ehemals stark GFP-positiven Einzelklons keinerlei Fluoreszenz im grünen Kanal auszumachen war (nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurden INS-1-Wildtyp-Zellen mit den oben genannten Antikörpern gefärbt und als Kontrolle herangezogen (C, obere Reihe). Ebenso wie die Antikörper gegen Kir6.2 und SUR1 färbt der anti-Insulin-Antikörper Punkte hauptsächlich im Zellinneren. Diese scheinen z.T. zu clusterartigen Populationen zusammengefasst und markieren möglicherweise spezielle

(Reserve-) „Pools“ von Insulin-sezernierenden Vesikeln. Die anti-Kir6.2-Färbung der INS-1-6.2-1684-H2 Zellen erscheint im Vergleich zum Wildtyp eher diffus, deutlich voneinander getrennte einzelne Punkte sind nicht auszumachen. Da die Zellen aber ihre GFP-Fluoreszenz und damit auch den Beleg der Integration der shRNA verloren haben, ist ihre Weiterverwendung riskant. Die von Einzelklonen abstammenden Populationen der INS-1-SUR1-2918-Zelllinie hatten ebenfalls ihre GFP-Fluoreszenz verloren (nicht gezeigt).



**Abbildung 13: Sortierung von INS-1-shRNA Einzelklonen mit niedriger, mittlerer und hoher GFP-Fluoreszenz.** (A) FACS-basierte Einzelklonablage von lentiviral transduzierten INS-1-6.2-1684 (a) und INS-1-SUR1-2918 (b) Zellen. Die Dot-Blots zeigen die Intensität der GFP-Fluoreszenz auf der Y-Achse und den sogenannten „forward scatter“ auf der X-Achse, welcher die Größe der Zellen beschreibt. Aus jedem GFP-Fluoreszenz Intensitätsbereich (Sortierfenster GFP hoch, mittel, niedrig) wurden Einzelzellen in 96-Loch Platten sortiert. (B) Western-Blot-Analyse von sortierten Einzelklonkolonien. Nachdem INS-1-6.2-1684-Einzelklone eine Dichte von  $10^7$  erreicht hatten, wurden jeweils 106 Zellen verschiedener Einzelklonzelllinien sortiert. INS-1-U6-Zellen dienen als Kontrolle (K). Zellysate gleicher Proteinmenge wurden über 10% SDS-PAGE aufgetrennt, gebロットet und die Blotmembran mit einem Antikörper gegen Kir6.2 detektiert. Es wurden jeweils drei Zelllinien aus dem ursprünglich niedrigen und mittleren, zwei aus dem hohen GFP-Intensitätsbereich analysiert. (C) Immunfluoreszenz der INS-1-6.2-1684-H2-Zelllinie (untere Reihe), die im Western-Blot eine reduzierte Expression von Kir6.2 zeigte, und der Kontrollzellen INS-1-Wildtyp (obere Reihe). Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Kir6.2 (rechts) bzw. gegen SUR1 (links) und Insulin (Mitte) inkubiert. Alexa-Fluor-594-gekoppelte Zweitantikörper ermöglichten die Detektion der Proteine im roten Bereich.

## 2.2 Die Rolle der 14-3-3-Proteine beim Transport der $K_{ATP}$ -Kanäle an die Zelloberfläche

Die Hauptaufgabe von ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen ist die Vermittlung zwischen dem Energiestatus der Zelle und der elektrischen Erregbarkeit der Plasmamembran (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999). Um diese Funktion adäquat erfüllen zu können, bedarf es der korrekten Zusammenlagerung von zwei Mal vier  $K_{ATP}$ -Untereinheiten zu einem funktionellen Oktamer, das an die Zelloberfläche transportiert wird. Damit nicht fälschlicherweise einzelne Untereinheiten oder Komplexe anderer Stöchiometrie an die Plasmamembran gelangen, besitzt sowohl die Kanal-Untereinheit Kir6.2 als auch das regulatorische SUR1 Protein Arginin-haltige ER-Lokalisationssignale (Zerangue und Schwappach et al, 1999)(Abbildung 5 (A)). Frühere Untersuchungen an Reporterproteinen haben gezeigt, dass das Arginin-Signal im Kontext des Kir6.2-C-Terminus sowohl vom Coatomer-Proteinkomplex-I (COPI) als auch von den cytosolischen 14-3-3-Proteinen erkannt wird (Yuan et al, 2003). Während COPI Proteine mit ER-Lokalisationssignalen vom Golgi zurück zum ER führen kann (sogenanntes „Retrieval“ oder Rückführung) (O’Kelly et al, 2002; Yuan et al, 2003; Vivithanaporn et al, 2006), schreiben Publikationen der letzten Zeit den multifunktionellen 14-3-3-Proteinen eine entscheidende Rolle beim Oberflächentransport von Arginin-haltige ER-Lokalisationssignale aufweisenden Membranproteinen zu (siehe auch Beispiele Abbildung 6) (Kuwana et al, 1998; O’Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002; Yuan et al, 2003; Brock et al, 2005). Mit der Bindung von 14-3-3-Proteinen an Arginin-haltige Sequenzen bzw. ER-Lokalisationssignale scheinen Proteinkomplexe Fahrscheine für den Transport zur Plasmamembran lösen und somit die Retention im ER überwinden zu können. Während für einige dieser Membranproteine, wie z.B. den Zwei-Poren- $K^+$ -Kanal TASK1, die 14-3-3 Bindung von der Phosphorylierung der 14-3-3 Bindestelle abhängt (Rajan et al, 2002; O’Kelly et al, 2002), ist für andere Membranreporterproteine wie z.B. CD4pLI-RKR, welches den C-Terminus von Kir6.2 tetramerisiert präsentiert, die Multimerisierung der Arginin-Signal-tragenden Proteinbereiche von Bedeutung (Yuan et al, 2003; Shikano et al, 2005; Michelsen et al, 2006).

Wie zu Anfang erwähnt weisen beide Untereinheiten des  $K_{ATP}$ -Kanals, nicht nur Kir6.2, sondern auch SUR1, ein RKR-ER-Lokalisationssignal auf. Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle 14-3-3-Proteine in Bezug auf den gesamten  $K_{ATP}$ -Komplex, seinen Transport zur Zelloberfläche und die funktionelle Inaktivierung der RKR-Signale spielen. Im Folgenden sollen verschiedene Methoden und Versuchsansätze wie die Reduktion der 14-3-3-Proteine in der Zelle, die Mutation der RKR-Signale im Kontext des Gesamtproteins und die Untersuchung von

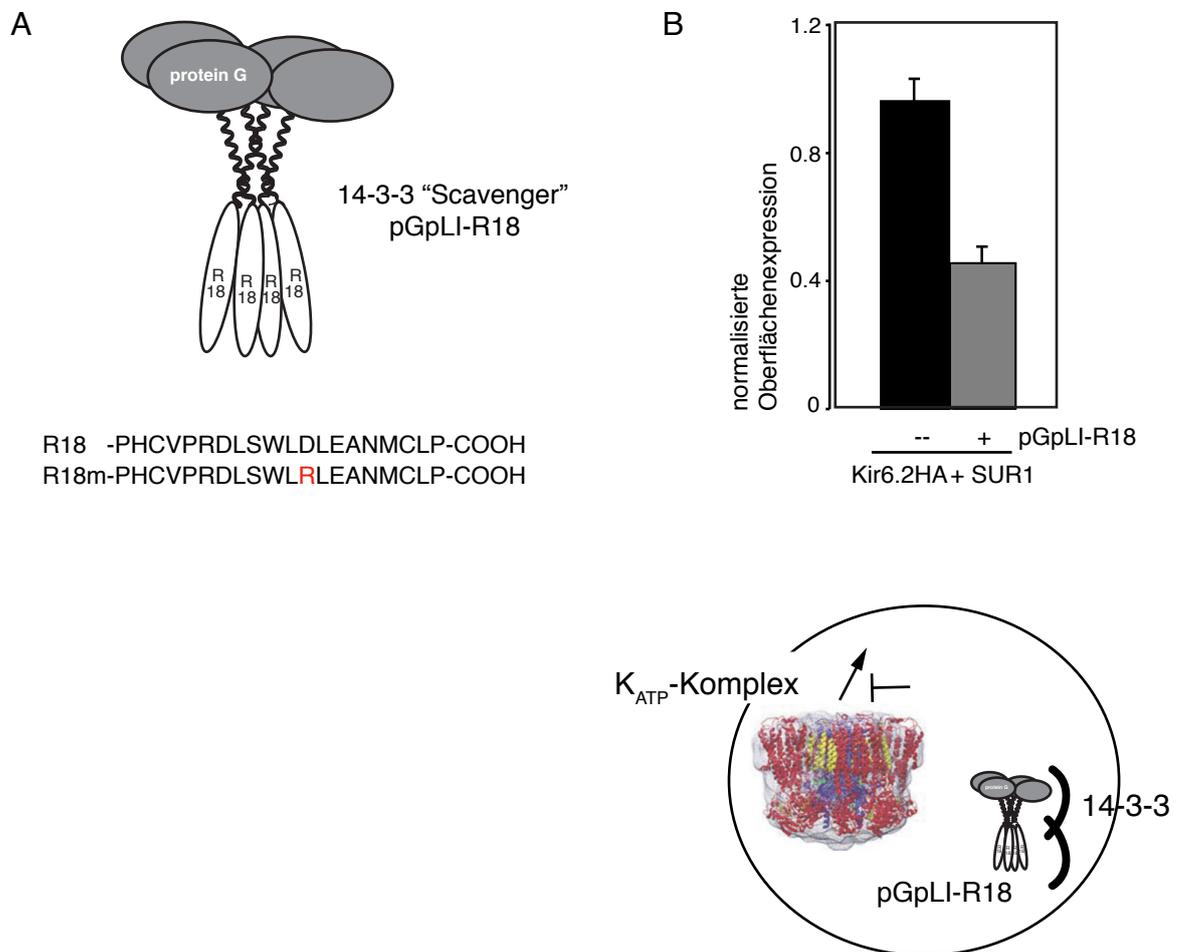
Reporterproteinen dazu führen, das Geheimnis der Beziehung zwischen 14-3-3 und  $K_{ATP}$  zu lüften.

## 2.2.1 Oberflächenexpression von $K_{ATP}$ -Kanälen und Reporterproteinen nach Manipulation zellulärer 14-3-3-Levels

### 2.2.1.1 Wirkung eines 14-3-3 „Scavengers“ in *Xenopus* Oocyten und Säugerzellen

Um den Einfluss von 14-3-3 auf  $K_{ATP}$  zu studieren, entwickelten wir einen künstlichen „14-3-3-Viefraß“ (zukünftig mit dem englischen Begriff Scavenger bezeichnet), eine Fusion aus Protein G, der Tetramere-ausbildenden Coiled-Coil-Domäne pLI (Harbury et al, 1993) und dem R18-Peptid, welches mit hoher Affinität und unabhängig von einer Modifikation durch Phosphorylierung 14-3-3-Proteine bindet (Wang et al, 1999) (Abbildung 14 (A)). Die Fähigkeit dieses „Scavengerproteins“ pGpLI-R18 14-3-3-Proteine an sich zu binden und diese damit für andere schwächer bindende Interaktionspartner unzugänglich zu machen, wurde in *Xenopus* Oocyten gezeigt (siehe auch Heusser und Yuan et al, 2006). Koexprimiert man den Scavenger zusammen mit rekombinantem Hämagglutinin(HA)-markiertem Kir6.2 und SUR1 in unbefruchteten Oocyten und misst die Oberflächenexpression der  $K_{ATP}$ -Kanäle in einem Luminometer, reduziert sich das Signal um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Expression ohne pGpLI-R18 (Abbildung 14 (B); Daten von Ioana Neagoe in Heusser und Yuan et al, 2006). Diese Daten legen nahe, dass 14-3-3-Proteine am Vorwärtstransport von  $K_{ATP}$ -Kanälen beteiligt sind.

Das oben beschriebene Scavengerprotein wurde auch in Säugerzellen eingesetzt, jedoch mit dem Ziel, möglichst viel 14-3-3-Proteine an einen sonst (im Vergleich zum R18-Peptid) schwach bindenden 14-3-3-Interaktionspartner zu rekrutieren (Abbildung 15 (A)). Für diesen Versuch wurde das den C-Terminus von Kir6.2 tragende tetramere Reporterprotein CD4pLI-RKR (Yuan et al, 2003) verwendet. Yuan et al haben gezeigt, dass nur mehrere Kopien des RKR-Peptids in räumlicher Nähe 14-3-3-Proteine mit höherer Affinität binden. COS-1-Zellen wurden transient mit dem CD4pLI-RKR Reporter alleine oder zusammen mit dem Scavenger pGpLI-R18 bzw. pGpLI-R18m, einer Mutante von R18, die kein 14-3-3 bindet (Jin und Donelson-Smith et al, 2004), transfiziert. Das Erscheinen von CD4 an der Oberfläche der COS-1-Zellen wurde luminometrisch bestimmt und zeigt, dass unter Koexpression von pGpLI-R18 das Reporterprotein verstärkt an die Plasmamembran transportiert wird, die Koexpression von pGpLI-R18m hingegen das Gegenteil bewirkt. Durch die Anwesenheit von zwei Coiled-Coil-Domänen kommt es in diesem besonderen Fall zur Ausbildung von „chimären“ Tetrameren aus

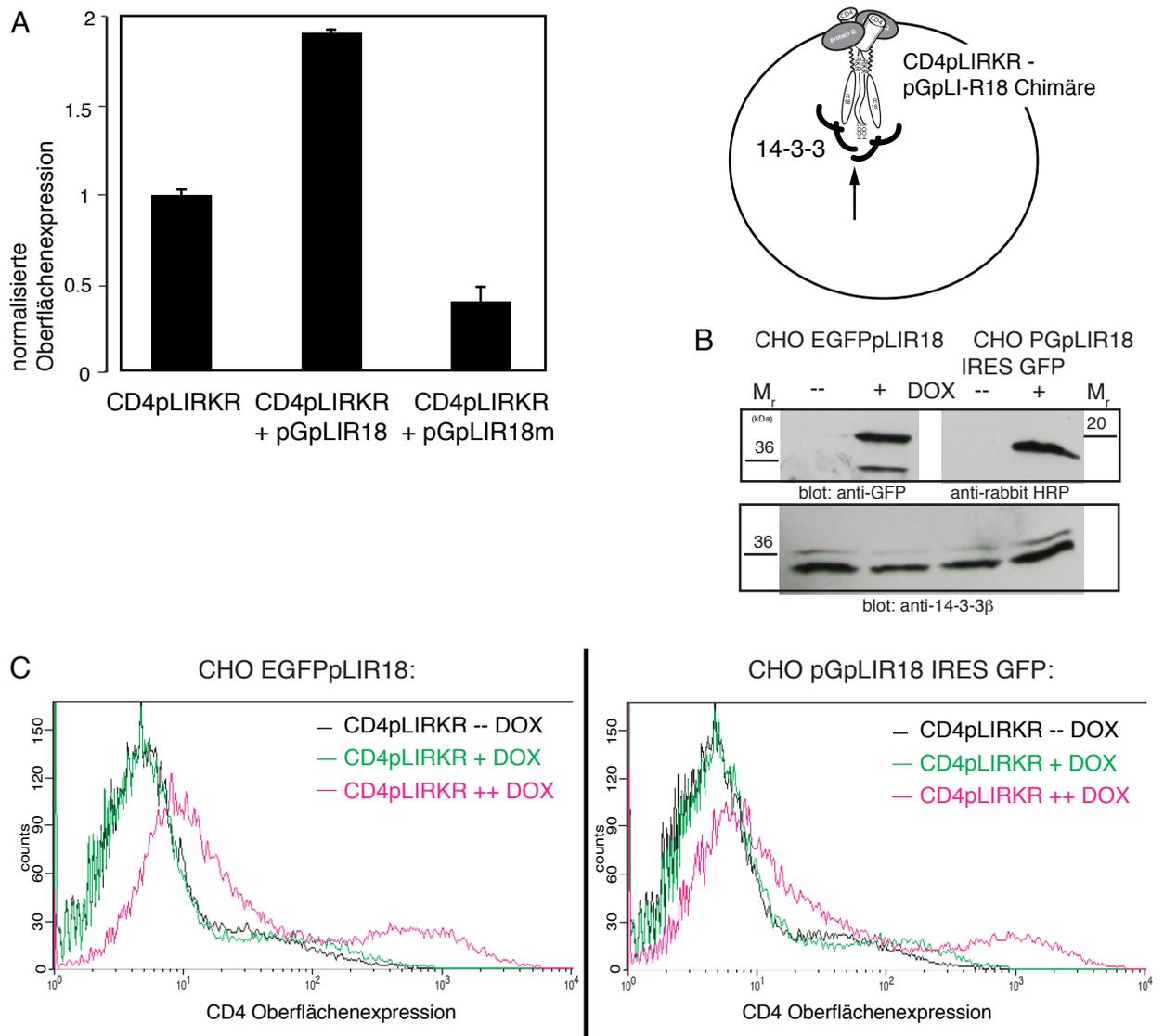


**Abbildung 14: Oberflächenexpression von  $K_{ATP}$ -Kanälen in *Xenopus* Oocyten ist sensitiv gegenüber 14-3-3 Reduktion.** (A) Schematische Darstellung des „Scavenger“ Fusionsproteins aus Protein G, der Tetramere-ausbildenden Domäne pLI und dem R18-Peptid, welches 14-3-3-Proteine mit hoher Affinität bindet (Wang et al., 1999) (oben). Sequenz des R18-Peptids und seiner Mutante (unten, Aminosäure rot markiert). (B) Oben: Oberflächenexpression von (von unabhängig voneinander exprimierten und HA-markierten Untereinheiten gebildeten)  $K_{ATP}$ -Kanälen in Oocyten, in Abwesenheit (--) oder Anwesenheit (+) des R18-Fusionsproteins. Die Oocyten wurden fixiert und mit HA (Hämagglutinin)-Antikörpern gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweit-antikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Daten wurden normalisiert auf die Werte gemessen in Abwesenheit von R18 (n=50) (Daten von Ioana Neagoe in: Heusser und Yuan et al, JCS 2006). Unten: Cartoon der Wirkungsweise des Scavengers auf  $K_{ATP}$ -Kanälen in Oocyten.

CD4-RKR und pG-R18, so wird 14-3-3 nicht von den Arginine-aufweisenden Proteinschwänzen abgezogen sondern hinzugefügt, d.h. auch wenn 14-3-3-Proteine nicht über den Kir6.2-C-Terminus sondern über R18 rekrutiert werden, wirken sie doch dem Retentionssignal entgegen und führen zu einem verstärkten Transport an die Zelloberfläche. Die Kontrolle hierfür liefert die R18-Mutante, welche gar nicht oder niederaffin 14-3-3 bindet. Durch die chimäre Multimerisierung von CD4-RKR und pG-R18m kann auch der Reporter CD4pLI-RKR weniger gut 14-3-3-Proteine binden. Dies führt zu einer Reduktion der Oberflächenexpression im Vergleich zur alleinigen Expression des CD4pLI-RKR Tetramers.

Vergleichbare Experimente wurden in einer CHO-(Chinesische Hamster Ovarien) Zelllinie, die Fusionen aus dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein EGFP und pLI-R18 bzw. Fusionen aus dem Scavengerprotein und GFP, getrennt durch die Sequenz für eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES, ermöglicht bicistronische mRNA) in ihr Genom integriert hat, durchgeführt. In Kollaboration mit Hebao Yuan wurden CHO-Zellen mit dem ecotropem Mausrezeptor MCAT-1 (Davey et al, 1997) für virales „Andocken“ und dem Transaktivator rtTA2-M2 für Doxycyclin-abhängige Proteinexpression mit Virionen transduziert, die die Fusionen EGFP-pLIR18 bzw. pGpLIR18IRESGFP auf dem viralen Expressionsplasmid pRevTre2 (Clontech/BD) in sich trugen. Nach einer Karenzzeit von zwei Tagen wurde die Expression der Fusionsproteine durch die Zugabe von Doxycyclin angeschaltet und nach einem weiteren Tag GFP-positive Zellen im Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS) sortiert. Abbildung 15 (B) zeigt die Western-Blot-Analyse der stabilen Zelllinien. Die Zellen wurden mit (+) oder ohne (-) Doxycyclin behandelt und 24h später lysiert, die Zelllysate über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Western-Blot-Detektion mit einem Antikörper gegen GFP (oben) zeigt die Regulierbarkeit der Proteinexpression. Die Detektion von 14-3-3-Proteinen (unten) verdeutlicht die Unabhängigkeit der endogenen 14-3-3 Expressionslevels von der Expression der Scavengerfusionsproteine.

Um wie zuvor in COS-1-Zellen die Wirkung des Scavengers auf die Oberflächenexpression des Reporters CD4pLI-RKR zu untersuchen, wurden beide CHO-Zelllinien transient mit CD4pLI-RKR transfiziert und mit (+) oder ohne (-) Doxycyclin behandelt bzw. schon 12h vor der Transfektion mit Doxycyclin (++) behandelt (Abbildung 15 (C)). Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion abgelöst, mit einem Allophycocyanin (APC)-konjugierten CD4-Antikörper sowie Propidiumiodid (markiert Zellkerne toter Zellen) gefärbt und im FACS analysiert. Histogramme, in denen die Zellzahl gegen die Intensität der CD4-Oberflächenfärbung aufgetragen worden ist, zeigen das gleiche Verhalten des Reporterproteins in beiden Zelllinien (Abbildung 15 (C), rechts und links). Wurden die Zellen zeitgleich transfiziert und mit Doxycyclin behandelt, verändert sich die CD4-Oberflächenfärbung kaum. Wird hingegen die Expression der Scavengerfusionen vor



**Abbildung 15: Oberflächenexpression des Reporterproteins CD4pLI-RKR in Säugerzellen wird verstärkt durch zusätzliche Rekrutierung von 14-3-3.** (A) Links: Oberflächenexpression des Membranreporterproteins CD4pLI-RKR, einer Fusion aus dem Glykoprotein CD4, pLI und dem Kir6.2 C-Terminus (Yuan et al., 2003). CD4pLI-RKR wurde transient in COS-1 Zellen transfiziert, alleine oder zusammen mit pGpLI-R18 bzw. pGpLI-R18m (Mutante von R18). Die Daten wurden normalisiert auf die Werte, die mit CD4pLI-RKR alleine gemessen wurden ( $n=4$ ). Rechts: Cartoon der Wirkungsweise des Scavengers in Verbindung mit dem Coiled-Coil Reporterprotein (siehe auch Cartoon Abbildung 14 (B)). (B) Western-Blot-Analyse der Zelllinien CHOEGFPpLIR18 und CHO pGpLIR18 IRES GFP. Zur Herstellung der Zelllinien wurden Verpackungszellen (HEK293T) mit dem retroviralen Expressionsplasmid pRevTre2EGFPpLIR18 bzw. pRevTre2pGpLIR18 IRES GFP und zwei Helferplasmiden transfiziert, die die Zellen zur Produktion von die gewünschte RNA enthaltenden Virionen anregen. Mit den viralen Partikeln wurden CHOMCAT-1-rtTA2-M2 Zellen transduziert, die aufgrund von MCAT-1 (ecotroper Mausrezeptor) Virionen aufnehmen können und durch die Expression eines Transaktivators (rtTA2-M2) sensitiv sind gegenüber Doxycyclin. Die Zellen sind am FACS über GFP-Fluoreszenz sortiert worden (nicht gezeigt), wurden mit oder ohne Doxycyclin behandelt und 24 h später ihre Proteinexpression getestet. Zellysate gleicher Proteinmenge wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Western-Blot-Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen GFP bzw. nur Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper gegen Kaninchen (oben) und gegen 14-3-3 (unten). (C) FACS-Analyse der oben beschriebenen CHO-Zelllinien. Die Zellen wurden transient transfiziert mit CD4pLI-RKR, mit oder ohne Doxycyclin behandelt (--/+), bzw. schon 12h vor der Transfektion mit Doxycyclin behandelt (++). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und mit Allophycocyanin (APC)-gekoppeltem anti-CD4-Antikörper sowie Propidiumiodid (markiert Zellkerne toter Zellen) gefärbt. Die Histogramme zeigen die Zellzahl auf der Y-Achse und die Intensität der CD4-Oberflächenexpression auf der X-Achse.

der Transfektion angekurbelt, ist der Reporter CD4pLI-RKR stärker an der Plasmamembran lokalisiert als ohne Scavenger. Somit ergibt sich ein mit (A) vergleichbares Bild des verstärkten Oberflächentransportes von CD4pLI-RKR unter zusätzlicher 14-3-3-Rekrutierung.

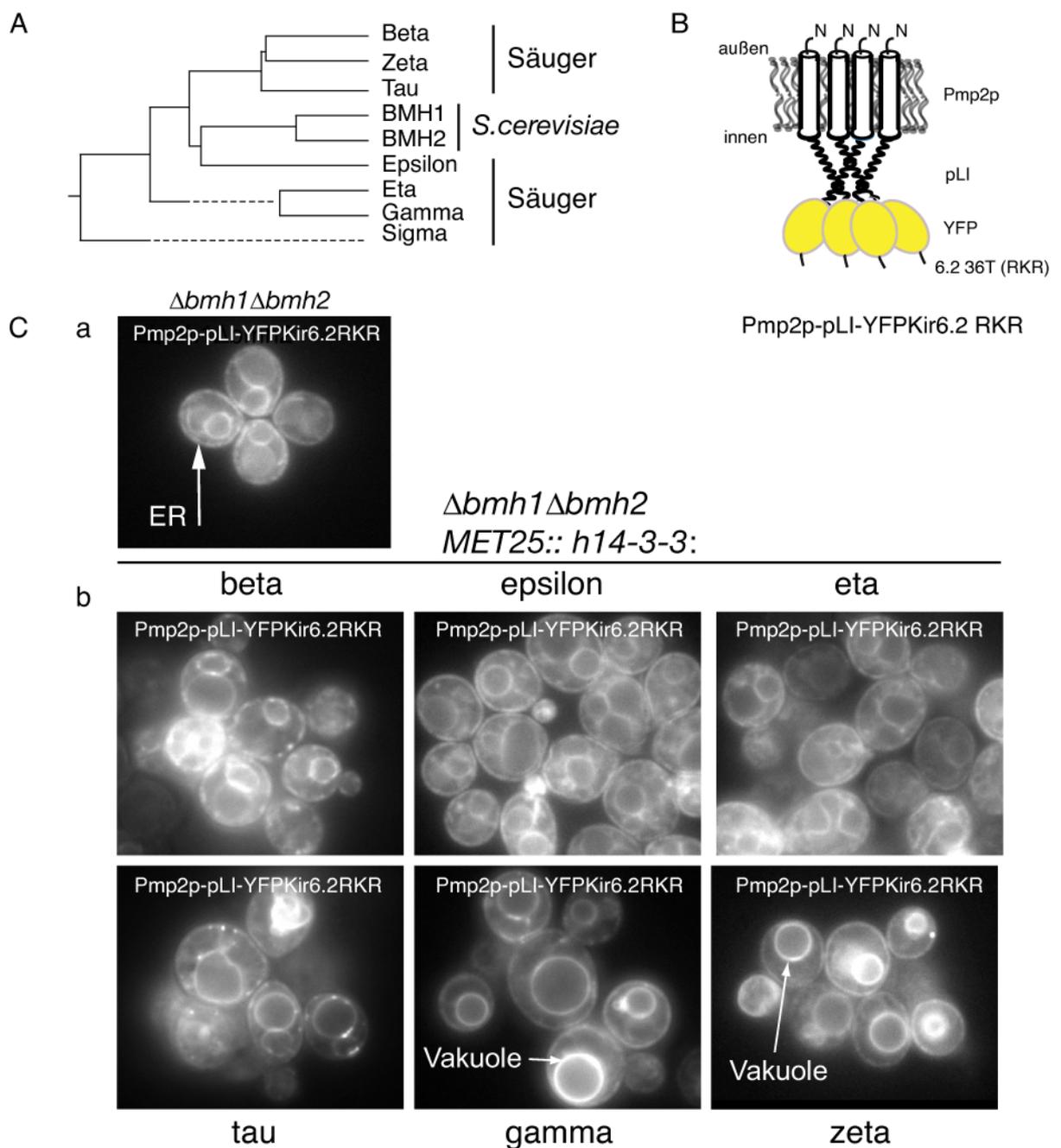
### **2.2.1.2 Einfluss von Säuger 14-3-3-Isoformen auf die Expression eines Reporters in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae***

14-3-3-Proteine sind kleine cytosolische, Dimere bildende Proteine, deren hohe Abundanz in eukaryotischen Zellen mit ihren vielfältigen Aufgaben in fundamentalen biologischen Prozessen korreliert (siehe Beispiel Abbildung 6)(van Hemert et al, 2001). Sieben Isoformen in Säugerzellen und 13 in *Arabidopsis thaliana* weisen Sequenzhomologien (auf Aminosäurebasis) von ca. 50% auf und können untereinander Homo- oder Heterodimer bilden. Die Isoformen unterscheiden sich vornehmlich in ihrem distalen C-Terminus, der jedoch nicht in die Bildung des Dimers oder der konservierten Liganden-Bindungstasche involviert ist. Den zahlreichen Isoformen in komplexeren eukaryotischen Zellen stehen nur zwei Isoformen – *BMH1* und *BMH2* – in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber (Abbildung 16 (A)). Diese Tatsache, zusammen mit den extrem guten Manipulationsmöglichkeiten des Hefegenoms machen *S.cerevisiae* attraktiv für die Untersuchung des intrazellulären Transportes von Membranproteinen in Abhängigkeit von 14-3-3-Proteinen bzw. einzelnen 14-3-3-Isoformen.

Michelsen et al zeigten mit Hilfe eines multimeren Membranreporterproteins, dass die Maschinerie zur Erkennung von speziell auf Argininen basierenden ER-Lokalisationssignalen evolutionär konserviert ist. Ein Fusionsprotein aus dem Hefemembranprotein Pmp2, der Coil-Coil-Domäne pLI, dem gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) und dem C-Terminus von Kir6.2 (Abbildung 16 (B)) konnte wie das vergleichbare Reporterprotein CD4pLIRKR (Yuan et al, 2003) die ER-Lokalisation überwinden und in die Vakuole transportiert werden. In Hefezellen wird die Sortierung von Proteinen in die Vakuole häufig als die DIE Route des Vorwärtstransportes angesehen (Nothwehr et al, 1994). Die Untersuchungen des Reporters in Hefezellen, in denen entweder die 14-3-3 Isoform *BMH1* oder *BMH2* deletiert war, belegten die Abhängigkeit des multimeren Reporterproteins von der Anwesenheit der *BMH1*-Isoform. Ohne dieses 14-3-3 Protein konnte Pmp2pLIYFPKir6.2-RKR das ER nicht verlassen. Michelsen et al ist es damit gelungen, die zuvor mit Kir6.2-Reporterproteinen in Säugern gemachten Beobachtungen – die Bindung von 14-3-3 an Kir6.2-RKR-Signale in Abhängigkeit vom multimeren Status des Membranproteins und dem hiermit verbundenen Transport an die

Plasmamembran – in Hefezellen zu bestätigen und zu erweitern im Hinblick auf die 14-3-3-Isoformspezifität.

Die Erkenntnisse und Werkzeuge dieser Arbeit konnten zur Untersuchung der Fragestellung bzgl. der 14-3-3-Isoformspezifität in Säugern genutzt werden. Hierfür wurden sechs der 14-3-3-Säugersequenzen unter der Kontrolle eines Methionin-reprimierbaren (MET25) Promotors über das Plasmid pRS306 stabil ins Genom solcher Hefezellen integriert, die weder BMH1 noch BMH2 exprimieren (Doppel-Deletion  $\Delta bmh1\Delta bmh2$ , Roberts et al, 1997). Aus unerfindlichen Gründen war es nicht möglich, die 14-3-3-Isoform Sigma in den Knockout-Hefestamm zu integrieren. Über Proteinfällung, SDS-PAGE und Western-Blot wurde die stabile Integration verifiziert (nicht dargestellt). Daraufhin wurde jeweils eine der Säuger-14-3-3-Isoformen-exprimierenden Hefezellen bzw. die Doppel-Deletions-Hefen ohne Säugerisoformen (als Kontrolle) mit einem das Reporterprotein-tragenden *CEN*-Plasmid transformiert, um zu sehen, ob irgendeine 14-3-3-Isoform aus Säugern die gleiche Rolle einnehmen kann wie die Hefe-Isoform BMH1. Die Lokalisation von Pmp2pLIYFPKir6.2-RKR wurde fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Hefezellen untersucht (Abbildung 16 (C)). Zellen mit den Isoformen Beta, Epsilon, Eta und Tau ((C) b) zeigen den Reporter wie die Doppel-Deletions-Kontrollzellen ((C) a) hauptsächlich in perinukleärem und subkortikalem ER, während Zellen mit den Isoformen Gamma und Zeta den Reporter in der Vakuole lokalisieren. Daraus lässt sich schließen, dass die Säuger-Isoformen 14-3-3-Gamma und -Zeta in Hefezellen spezifisch mit multimeren, Arginin-Sequenzen-präsentierenden Kir6.2-Reporterproteinen interagieren und deren Vorwärtstransport ermöglichen (Daten erhoben von Eric Clement Arakel im Zuge eines von mir betreuten Laborpraktikums).



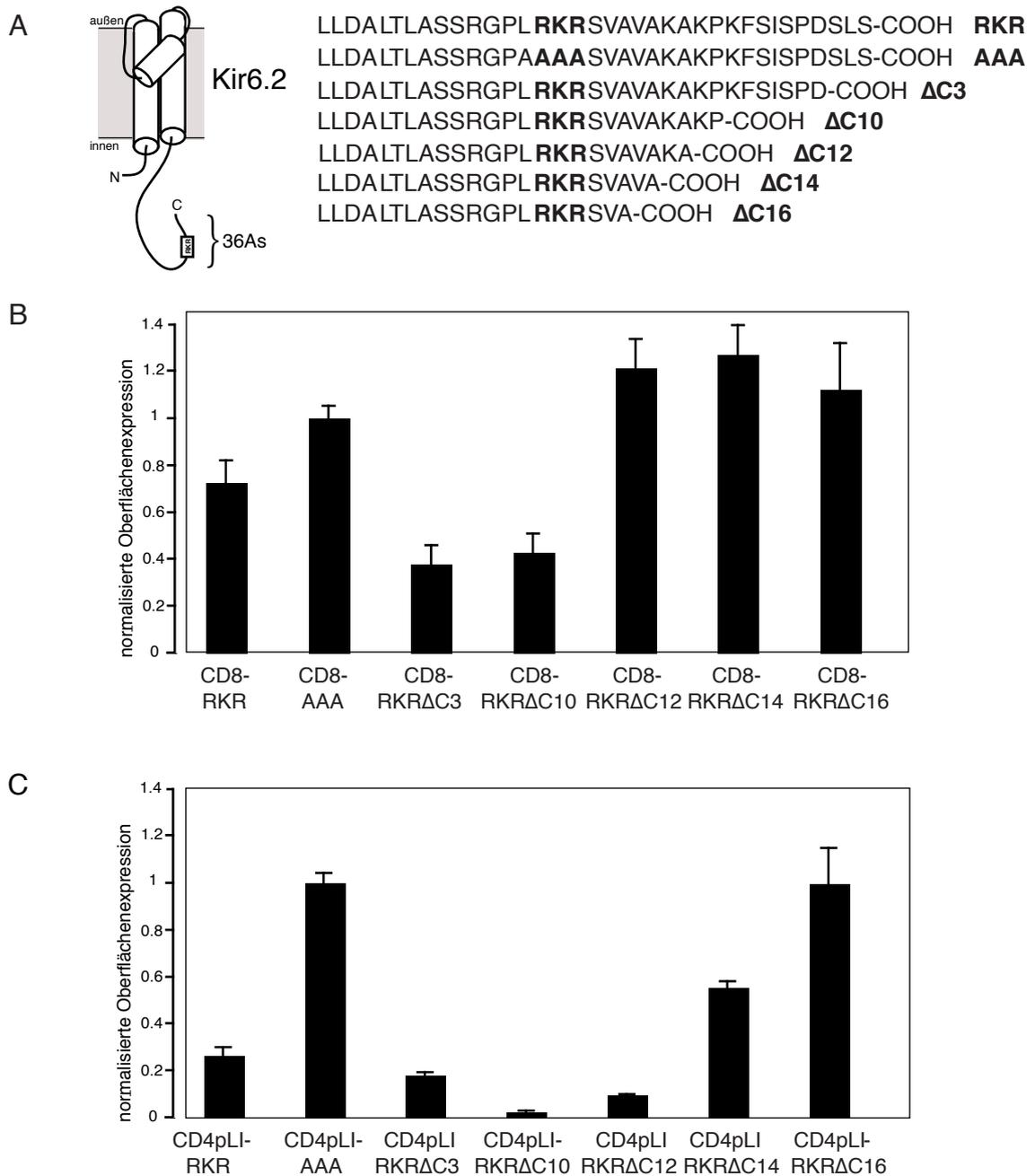
**Abbildung 16: 14-3-3-Proteine aus Säugern ermöglichen den Vorwärtstransport eines multimeren Membranproteinreporters in Hefe.** (A) Dendrogramm der 14-3-3-Proteine. Während Säugerzellen sieben verschiedene 14-3-3-Isoformen aufweisen, zählt man bei Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nur zwei. (B) Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus dem Hefe-Membranprotein Pmp2, der Tetramere-ausbildenden Domäne pLI, dem Gelb-fluoreszierenden Protein YFP und den 36 C-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 mit aktivem RKR Signal (aus: Michelsen et al, 2006). (C) a: Fluoreszenzbilder von lebenden ( $\Delta bmh1 \Delta bmh2$ ) Hefezellen, die das in (B) beschriebene Reporterprotein über ein *CEN* Plasmid exprimieren. b: Fluoreszenzbilder von lebenden ( $\Delta bmh1 \Delta bmh2$ ) Hefezellen, in deren Genom verschiedene 14-3-3-Isoformen aus Säugern integriert worden sind. Diese Zellen exprimieren ebenfalls das Reporterprotein über ein *CEN* Plasmid. Die weißen Pfeile markieren entweder perinukleäres ER oder Vakuole.

## 2.2.3 Oberflächenexpression und Interaktionsverhalten von mutierten $K_{ATP}$ -Kanälen und Reporterproteinen

Eine C-terminale Trunktionsvariante des zuvor beschriebenen tetrameren Hefe-Kir6.2-Reporters – das Stop-Codon wurde nach Lysin 383 eingeführt – konnte in Wildtyp-*S.cerevisiae*-Hefezellen trotz Multimerisierung und Anwesenheit beider 14-3-3-Proteine nicht in die Vakuole transportiert werden, sondern lokalisierte im ER. Diese Beobachtung legt nahe, dass Aminosäuren außerhalb der RKR-Sequenz für die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen eine Rolle spielen. Möglicherweise existieren im C-Terminus von Kir6.2 mehrere 14-3-3-Bindungsstellen, so wie auch bei anderen Proteinen von niederaffin und hochaffin oder mehreren niederaffin 14-3-3-Bindestellen in Kombination vorkommen (Coblitz et al, 2006; Giles et al, 2003; Würtele et al, 2003). Weiterhin könnten die Aminosäuren stromabwärts des Retentionssignals RKR von Bedeutung sein für die Stabilität der Bindung an RKR.

### 2.2.3.1 Oberflächenverhalten von Kir6.2-Reporterproteinen mit verkürzten C-Termini

Zur Untermauerung dieser Hypothese wurde der Carboxyterminus von Kir6.2 systematisch trunziert (Abbildung 17 (A)) und als Fusion mit dem dimeren Oberflächenprotein CD8 bzw. dem über pLI künstlich tetramerisierten CD4 in einen Säugerexpressionsvektor (pcDNA3, Invitrogen) kloniert. COS-1-Zellen wurden mit diesen Reporterproteinen transient transfiziert und das Oberflächenverhalten dieser Proteine quantitativ im Luminometer gemessen. Abbildung 17 (B) zeigt die Oberflächenexpression der dimeren Konstrukte (CD8-), Abbildung 17 (C) die der tetrameren Konstrukte (CD4pLI). Die Messdaten wurden normalisiert auf die Werte von CD8-AAA (B) bzw. CD4pLI-AAA(C), beides zuvor beschriebene Reporterstrukture mit inaktivem ER-Lokalisationssignal (Yuan et al, 2003). Vergleicht man die Werte mit dem des „Wildtyp“-Reporters CD8-RKR, reduziert die Wegnahme der letzten drei bis zehn Aminosäuren die Oberflächenexpression des CD8-Reporters um etwa die Hälfte. Weitere Trunkationen bis kurz vor das RKR-Signal verstärken hingegen den Vorwärtstransport sogar mehr als die Mutation des Retentionssignals (B). Betrachtet man die Daten der tetrameren Reporter, zeigen sich noch drastischere Effekte. Zum einen unterscheiden sich CD4pLI-RKR und CD4pLI-AAA in ihrer Oberflächenpräsenz, zum anderen weist Trunkation -RKR $\Delta$ C12 nun auch eine starke Reduktion auf, nicht jedoch -RKR $\Delta$ C14 und -RKR $\Delta$ C16.



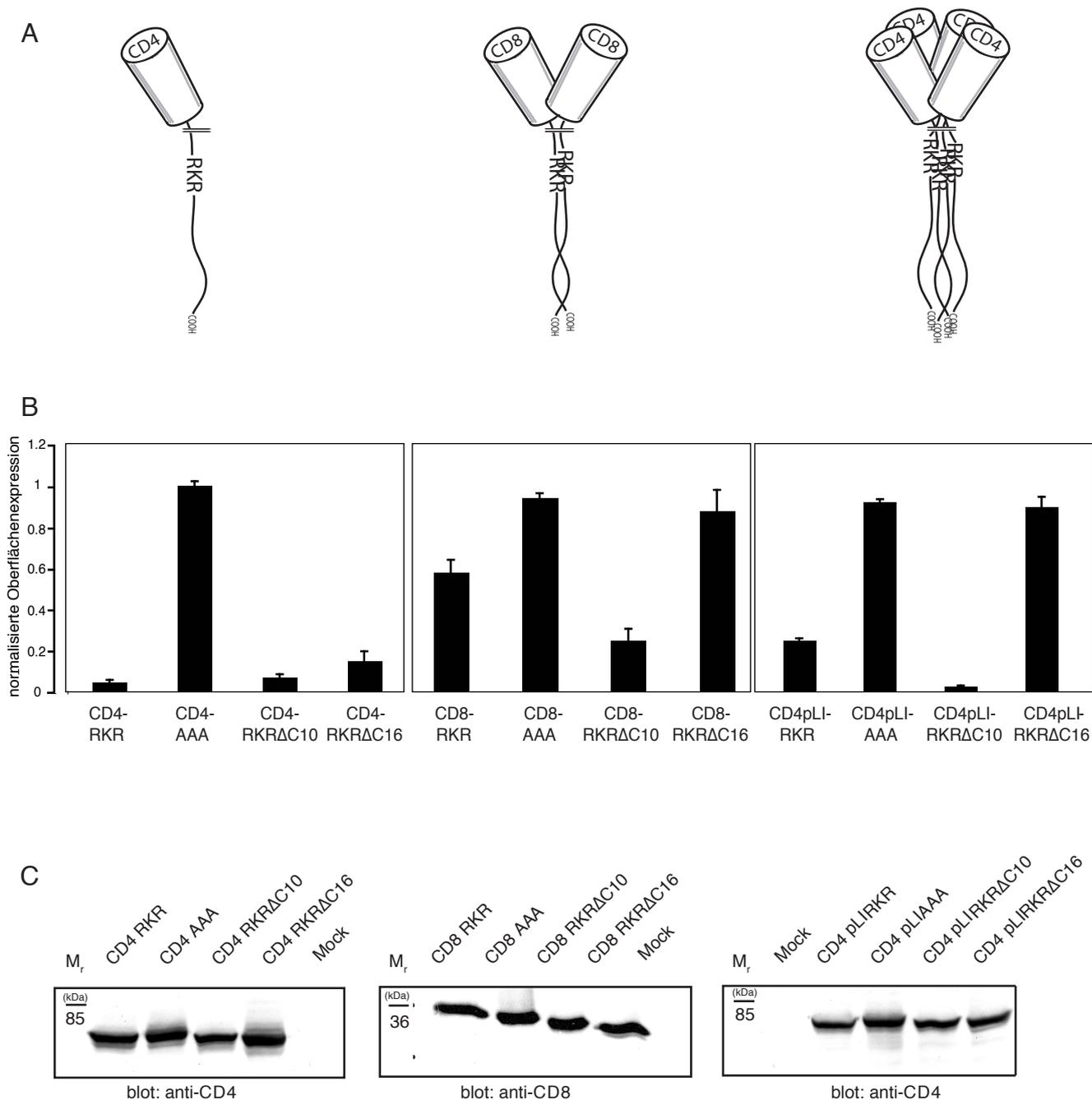
**Abbildung 17: Carboxyterminale Trunkationen von Kir6.2 beeinflussen die Oberflächenexpression von CD8- und CD4-Reportern** (A) Schematische Darstellung von Kir6.2, der Kanal-bildenden Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals (links). Aminosäuresequenz der letzten 36 C-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 und seinen Mutations- und Trunktationsvarianten (rechts). (B) Oberflächenexpression von Fusionsproteinen aus dem Dimere bildenden Oberflächenprotein CD8 und den oben aufgelisteten Varianten von Kir6.2 in COS-1-Zellen. 24h nach der transienten Transfektion mit den Fusionsproteinen wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte wurden normalisiert auf die Werte von CD8-AAA (n=6). (C) Oberflächenexpression von Fusionsproteinen aus dem monomeren Oberflächenprotein CD4, der Tetramere bildenden Domäne pLI (Harbury et al, 1993) und den oben aufgelisteten 36T-Varianten von Kir6.2 in COS-1-Zellen. 24h nach der transienten Transfektion mit den Fusionsproteinen wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte wurden normalisiert auf die Werte von CD4pLI-AAA (n=6).

Unterschiede zwischen den CD8- und CD4pLI-Fusionen spiegeln möglicherweise zum einen den Einfluss der im Kir6.2 C-Terminus befindlichen Sortierungssignale in Abhängigkeit vom Multimerisierungsstatus wieder, zum anderen die Unterschiede im Vorwärtstransport zur Plasmamembran bzw. der Endozytoserate der beiden Glykoproteine CD8 und CD4 (Aiken et al, 1994). Um diesen Einflussfaktoren genügend Rechnung zu tragen, wurden jeweils zwei C-terminale Trunkationen mit gegensätzlichem Oberflächenverhalten ausgewählt und an CD4 alleine - als monomere Variante – fusioniert. Im Folgenden wurde der Einfluss des Kir6.2 C-Terminus mit aktivem Retentionssignal (-RKR), mit inaktivem ER-Lokalisationssignal (-AAA) und der Einfluss der beiden Trunkationsvarianten -RKR $\Delta$ C10 und -RKR $\Delta$ C16 auf das Oberflächenverhalten von monomerem CD4, dimerem CD8 und tetramerem CD4pLI untersucht (Abbildung 18). COS-1-Zellen wurden mit den beschriebenen Konstrukten transient transfiziert und nach 24h die Exposition der Reporterproteine an der Plasmamembran nach Färbung mit anti-CD4 oder anti-CD8-Antikörpern quantitativ im Luminometer bestimmt (Abbildung 18 (B)). Wie schon zuvor beschrieben (Yuan et al, 2003; Zerangue und Schwappach et al, 1999) kann monomeres CD4-RKR ((B) links) aufgrund der ER-lokalisierenden Aktivität des Arginin-Signals die Plasmamembran nicht erreichen. Im Gegensatz dazu ermöglicht eine Multimerisierung – in Form von Dimerisierung über CD8 ((B) Mitte) oder Tetramerisierung über CD4pLI ((B) rechts) – den effizienten Transport an die Zelloberfläche. Dies stimmt überein mit vorangegangenen Ergebnissen (Michelsen et al, 2006; Yuan et al, 2003) und erlaubt die Interpretation im Hinblick auf die Fähigkeit von 14-3-3-Proteinen mit multimeren Kir6.2-Reportern zu interagieren und damit die Interaktion dieser mit COPI zu unterbinden (Yuan et al, 2003). Inaktiviert man das ER-Lokalisationssignal durch Mutation (-AAA), sind alle Proteine unabhängig von der Anzahl der C-Termini stark Oberflächen-exponiert (B). Die Deletion der letzten zehn Aminosäuren von Kir6.2 ermöglicht weder dem monomeren Reporter CD4-RKR $\Delta$ C10 ((B)links) noch den multimeren Versionen CD8-RKR $\Delta$ C10 ((B) Mitte) und CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 ((B) rechts) den Vorwärtstransport. In diesem Fall scheint die Bindung an COPI gegeben, die Interaktion mit 14-3-3 aber verhindert. Möglicherweise spielen die letzten zehn Aminosäuren beim Zusammenspiel von 14-3-3-Bindung an multimeren Kir6.2-Schwänze und Verstärkung des Vorwärtstransportes eine wichtige Rolle.

Die Wegnahme weiterer Aminosäuren (-RKR $\Delta$ C16) resultiert in einer verstärkten Oberflächenexpression des monomeren CD4-Fusionsproteins ((B) links) und lässt CD8 und CD4pLI massiv an der Zellmembran erscheinen ((B) Mitte und rechts). Diese Kir6.2-Variante stellt vermutlich eine Kombination aus beeinträchtigter Erkennung durch COPI und verminderter 14-3-3-Bindungsfähigkeit dar. Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Erscheinung an

der Zelloberfläche in verschiedenen Expressionsniveaus begründet liegt, wurden COS-1-Zellen wie in B transient transfiziert und nach 24h lysiert. Zellextrakte gleichen Proteingehaltes wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Western-Blot-Detektion erfolgte mit anti-CD4- bzw. anti-CD8-Antikörpern (Abbildung 18 (C)).

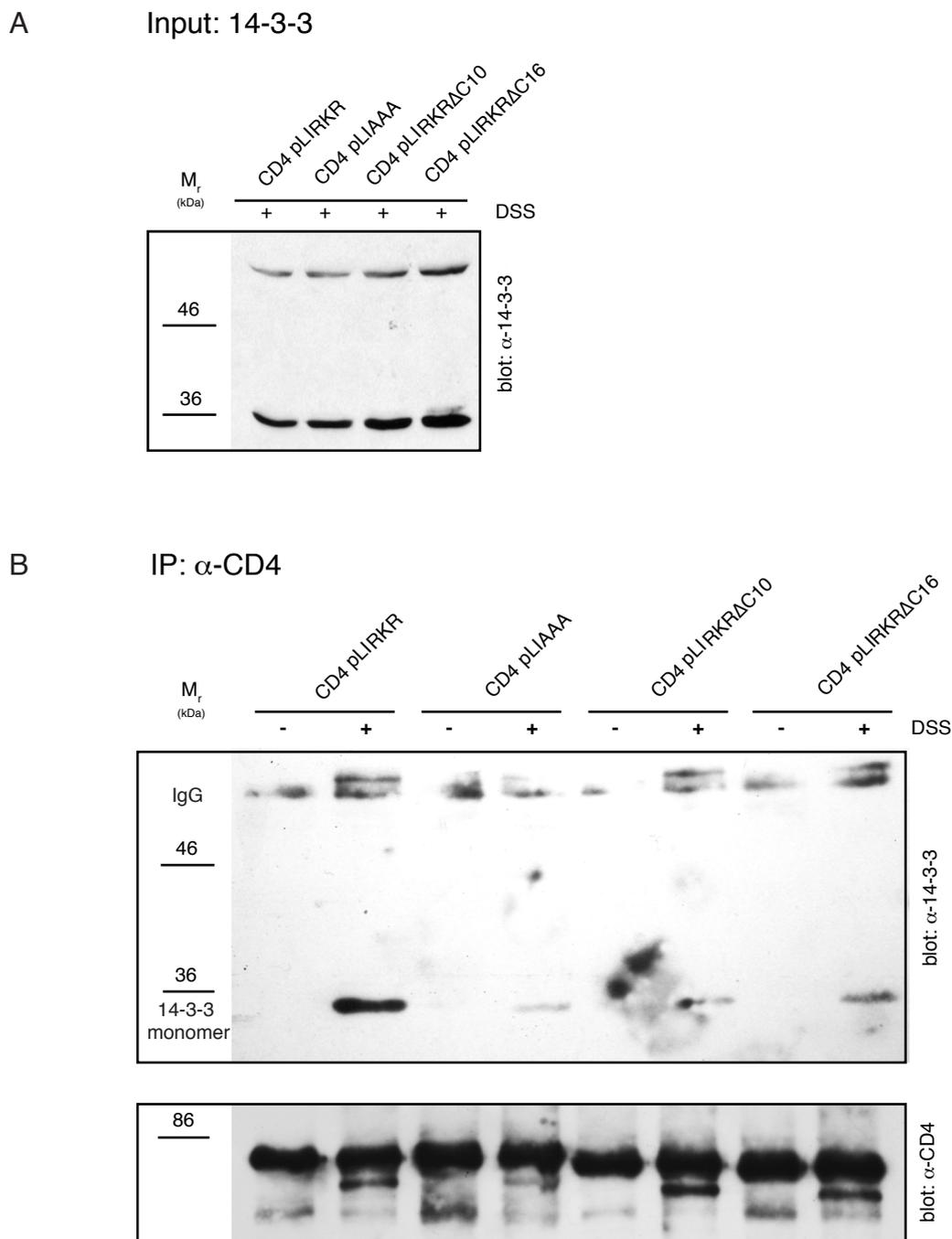
Monomere CD4-Reporter und tetramere CD4pLI-Reporter werden am ehesten den nativen Zuständen des Kir6.2 Proteins gerecht – als einzelne Untereinheit mit exponiertem ER-Lokalisationssignal bleibt es im ER, als Tetramer assembliert es mit SUR1 und wird daraufhin an die Zelloberfläche transportiert. Außerdem sind die Reporterproteine aufgrund der gleichen Membranproteinanteils CD4 miteinander vergleichbar.



**Abbildung 18: Ausgewählte C-terminale Trunkationen von Kir6.2 beeinflussen die Oberflächenexpression von monomeren CD4-, dimeren CD8- und tetrameren CD4pLI- Oberflächenproteinen (A)** Cartoons der verschiedenen Reporter-membranproteine: monomeres CD4, dimeres CD8 und tetrameres CD4pLI, fusioniert an den C-terminalen Kir6.2-Schwanz und seine Varianten. (B) Oberflächenexpression der C-terminalen 6.2 Varianten –RKR (Wildtyp), -AAA, - RKRΔC10 und -RKRΔC16 fusioniert an CD4 (links), CD8 (Mitte) oder CD4pLI (rechts) in COS-1 Zellen. 24h nach der transienten Transfektion der Fusionsproteine wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD4 bzw. CD8 gefärbt. Meerrettich-Peroxidasegekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte sind normalisiert auf die –AAA Konstrukte (n=9). (C) Western-Blot-Analyse von COS-1-Zellen, transient transfiziert wie in (B) zur Darstellung der gleichen Expressionsniveaus. Zelllysate gleicher Proteinmenge wurden über 10% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Western-Blots mit Antikörpern gegen CD4 bzw. CD8 detektiert. Mock= COS-1-Zelllysate (siehe auch Heusser und Yuan et al, 2006).

### 2.2.3.2 Immunpräzipitation von multimeren Kir6.2-Reportern mit verkürzten C-Termini

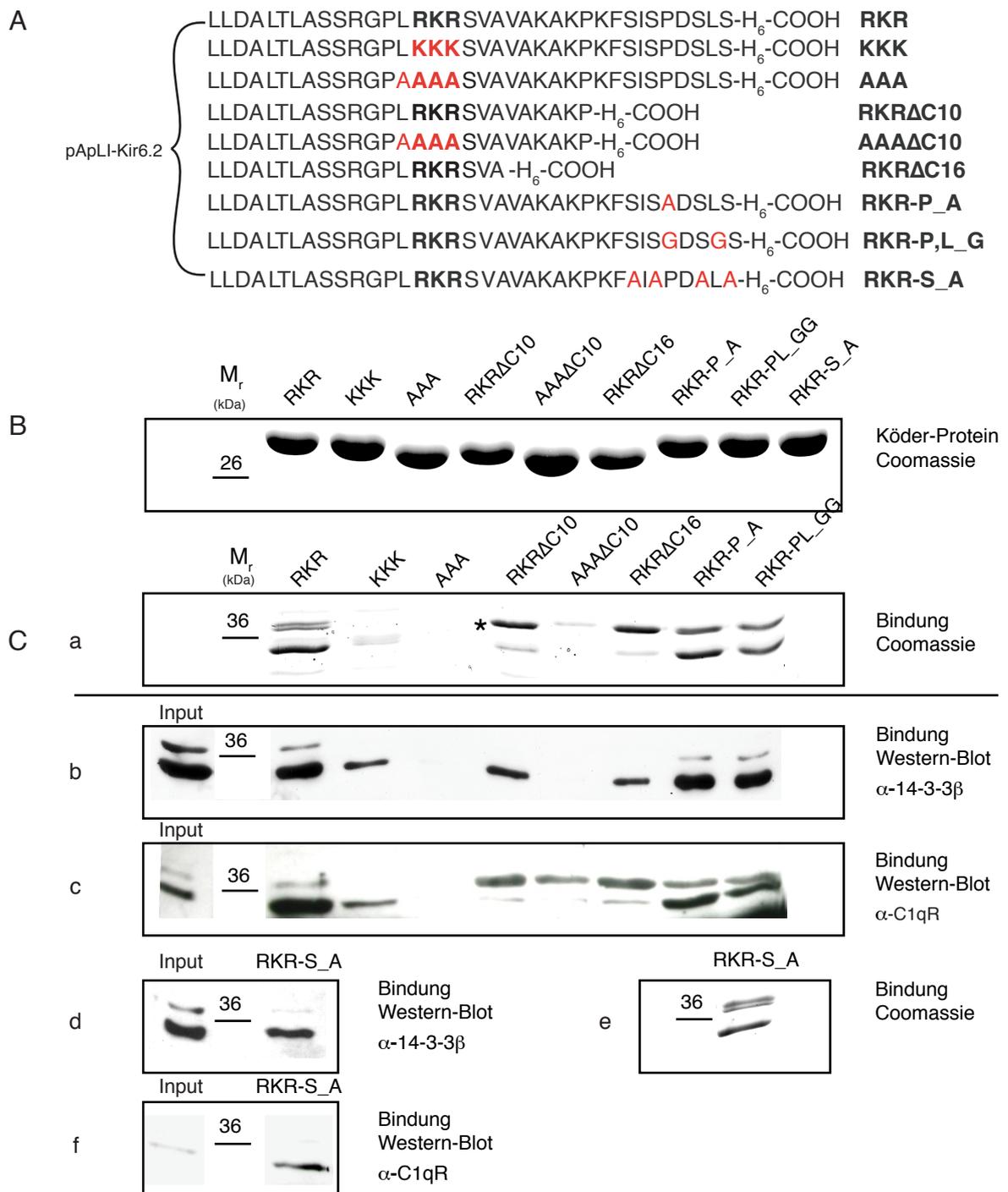
Um die Korrelation zwischen Bindung an 14-3-3-Proteine und Oberflächentransport für die CD4pLI-Reporter experimentell zu bestätigen, wurden HEK293T-Zellen transient mit den zuvor beschriebenen Kir6.2 Varianten transfiziert, nach 24h mit oder ohne den „Kreuzvernetzer“ (crosslinker) Disuccinimidylsuberat (DSS) behandelt und lysiert (Yuan et al, 2003). Die Fusionsproteine in den Zelllysaten wurden über einen anti-CD4-Antikörper an Protein-G Sepharosebeads gebunden und schließlich mit SDS-Puffer eluiert. Die Eluate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Western-Blot-Membranen wurden mit Antikörpern gegen 14-3-3 (Abbildung 19 (B) oben) und CD4 (Abbildung 19 (B) unten) detektiert. Die Mutations- und Trunkationsvarianten von Kir6.2 koimmunpräzipitieren deutlich weniger 14-3-3-Proteine als der „Wildtyp“-C-Terminus fusioniert an CD4pLI. Die CD4-Proteine sind in vergleichbaren Mengen immunpräzipitiert worden ((B) unten). Abbildung 19 (A) zeigt eine Detektion der monomeren und dimeren 14-3-3-Proteine in den für die Immunpräzipitation eingesetzten mit DSS behandelten Zellextrakten.



**Abbildung 19: 14-3-3-Bindung an CD4pLI-Reporterproteine korreliert mit ihrem Erscheinen an der Zelloberfläche.** Koimmunpräzipitation von 14-3-3-Proteinen und den Fusionsproteinen CD4pLI-RKR, -AAA, -RKRΔC10 und -RKRΔC16. HEK293T-Zellen wurden transient mit beschriebenen Konstrukten transfiziert und mit (+) oder ohne (-) Crosslinker Disuccinimidylsuberat (DSS) behandelt. Zelllysate wurden mit  $\alpha$ -CD4Antikörpern inkubiert und anschließend über Protein G-Beads gegeben. 10% der Zellextrakte (Input, A) bzw. Eluate (B) wurden über 10% SDS-PAGE augetrennt und geblottet. (A) Western-Blot-Detektion der 14-3-3-Proteine im Input. (B) Western-Blot-Detektion der  $\alpha$ -CD4-Immünpräzipitation mit einem Antikörper gegen 14-3-3 (oben) und einem  $\alpha$ -CD4-Antikörper (unten). IgG deutet auf die Bande hin, die möglicherweise durch Kreuzvernetzung der schweren IgG-Ketten entstanden ist (siehe auch Heusser und Yuan et al, 2006).

### 2.2.3.3 Bindungsexperimente mit tetrameren Kir6.2-Affinitätskonstrukten

Zur Untermauerung der bisher erhobenen Daten wurden weitere Bindungs-Experimente durchgeführt. Tetramere Affinitätskonstrukte (Köderproteine) aus Protein A, der Coiled-Coil-Domäne pLI, dem C-Terminus von Kir6.2 bzw. dessen Mutationen und Trunkationen (Abbildung 20 (A)) und einem Hexa-Histidin-Anhang wurden in *Escherichia coli* (*E.coli*)-Bakterienzellen exprimiert und über die an Nickel-Agarose-bindenden Histidine aufgereinigt (Yuan et al, 2003). Gleiche Mengen des aufgereinigten Proteins wurden über Protein A an IgG-Sepharose immobilisiert und mit zytosolischem Extrakt aus HeLa-(humane Fibroblastenzelllinie) Zellen inkubiert. Nach Elution der an die Köder bindenden Proteine mittels  $MgCl_2$ , wurden diese gefällt, in SDS-Puffer gelöst und schließlich über SDS-PAGE getrennt. Abbildung 20 (C) a+e zeigt ein Coomassie-Brilliant-Blau-gefärbtes SDS-Gel, über das 40% der Eluate aufgetrennt worden sind. Die prominente Bande unterhalb des 36kDa-Markers stellt 14-3-3 Protein dar (Yuan et al, 2003). Die obere Bande von -RKR $\Delta$ C10 wurde massenspektrometrisch analysiert und enthielt hauptsächlich C1qR, ein Typl-Zellmembranprotein, welches Homodimere ausbildet (Fonseca et al, 2001). Bei -RKR erscheinen zwei obere Banden, vermutlich repräsentieren sie C1qR und 14-3-3-Epsilon, welches höher läuft als die anderen 14-3-3-Isoformen (Yuan et al, 2003). 20% ((C) b+d) bzw. 40% ((C) c+f) der Eluate wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE geblottet. Western-Blot b und d wurde mit einem Antikörper gegen 14-3-3 detektiert, Blot c und f mit einem anti-C1qR-Antikörper. Wie schon anhand der Coomassie-Banden in a vermutet, stellt die Bande unterhalb des Markers und eine oberhalb 14-3-3-Protein dar (b Input). Das Affinitätskonstrukt -RKR bindet beide 14-3-3-Isoformen in gleichem Maße wie die Mutanten -RKR-P\_A, -RKR-PL\_GG (b) und -RKR-S\_A (d). Die Kir6.2-Variante mit inaktivem ER-Lokalisationssignal (-AAA) sowie die Kombination aus inaktivem ER-Lokalisationssignal und der Trunkation (-AAA $\Delta$ C10) vermag kein 14-3-3 Protein mehr zu binden (b). Eine andere Kir6.2-Variante mit inaktivem ER-Lokalisationssignal (-KKK) und die schon bekannten Trunkationen -RKR $\Delta$ C10 und -RKR $\Delta$ C16 haben viel weniger 14-3-3 gebunden als -RKR (b). Der Western-Blot, der mit anti-C1qR detektiert worden ist (c+f), bestätigt das Bandenmuster des Coomassie-Gels. Die obere Bande, die vor allem bei den Trunkationen und Mutationen prominent erscheint, enthält das Protein C1qR.

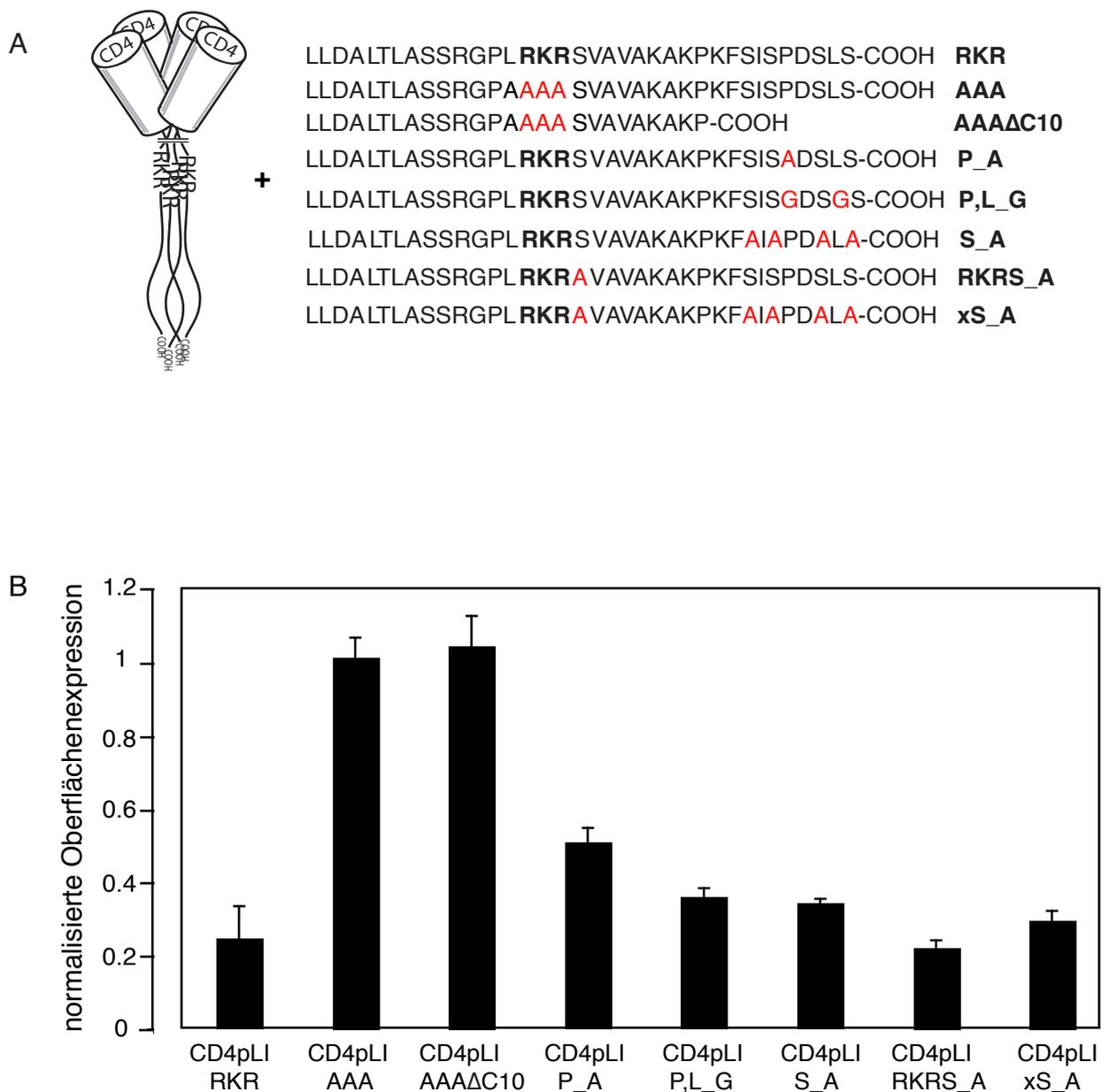


**Abbildung 20: Trunkationen des C-Terminus und Mutationen des RKR-Signals beeinträchtigen die Bindung von 14-3-3 an Kir6.2.** (A) Aminosäuresequenz von in Bakterien exprimierten und aufgereinigten Reporterproteinen. Die letzten 36 C-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 und seinen Mutations- (rot) und Trunktationsvarianten wurden an Protein A und die Tetramere bildende Domäne pLI fusioniert (-RKR, -KKK aus Yuan et al, 2003). (B) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PAGE demonstriert die „Köder-“ Proteine, die mittels SDS-Probenpuffer von den IgG-Sepharose-Beads eluiert und über ein 15% SDS-PAGE aufgetrennt wurden. (C) Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE und Western-Blot-Detektionen zeigen die Proteine eines HeLa-Zell-extraktes, die an die über IgG-Sepharose-immobilisierten Köderproteine gebunden haben. Der Input enthält 2% des eingesetzten HeLa-Zelllysates. Im Coomassie-Gel (C a) erschien eine prominente Bande (mit \* gekennzeichnet), die mittels Massenspektrometrie analysiert wurde. Diese Bande enthielt p32/C1qR, ein Typ1 Membranprotein (Fonseca et al, 2001). b+d Western-Blot-Detektion mit Antikörper gegen 14-3-3-β. c+f Western-Blot-Detektion mit Antikörper gegen C1qR (siehe auch Heusser und Yuan et al, 2006).

Die dargestellten Bindungsexperimente bestätigen die zuvor im quantitativen Oberflächenexperiment und Koimmunpräzipitationsversuch erhobenen Daten. Trunkation ebenso wie Mutation der RKR-Sequenz bewirken eine Reduktion der 14-3-3-Bindung an den tetramerisierten C-Terminus von Kir6.2. Aminosäuren außerhalb der RKR-Sequenz sind von Bedeutung, wobei keine Sequenzspezifität vorzuliegen scheint, denn Mutationen in den letzten zehn Aminosäuren (P-A, PL-GG, S-A) beeinträchtigen die Effektivität der 14-3-3-Bindung nicht.

#### **2.2.3.4 Oberflächenverhalten von Kir6.2-Reporterproteinen mit C-terminalen Mutationen**

Aus Gründen der Vollständigkeit wurden die bisher nur im Bindungsexperiment eingesetzten Mutationsvarianten von Kir6.2 (-AAA $\Delta$ C10, -RKRP\_A, -RKRPL\_GG, -RKRS\_A) und die Mutanten -RKRS\_A und -xS\_A (Abbildung 21 (A)) mit CD4pLI fusioniert und einem Oberflächenexperiment unterzogen. Hierfür wurden COS-1-Zellen mit Säuger-Expressionsplasmiden, die für die in A aufgelisteten Reporterproteine kodieren, transient transfiziert und 24h später das Oberflächenverhalten nach CD4-Färbung luminometrisch bestimmt (B). Die Kombination aus inaktivem ER-Lokalisationssignal und Deletion der letzten zehn Aminosäuren (-AAA $\Delta$ C10) verursacht eine mit -AAA vergleichbare Oberflächenexpression. Auf den Oberflächentransport von multimeren Reporterproteinen mit inaktivem ER-Lokalisationssignal scheinen die letzten zehn Aminosäuren von Kir6.2 keinen Einfluss zu haben. Dies könnte bedeuten, dass 14-3-3-Proteine ausschließlich für den Vorwärtstransport von Proteinen mit aktivem ER-Lokalisationssignal eine Rolle spielen, sprich für solche Proteine relevant sind, die auch mit COPI interagieren können (Yuan et al, 2003). Mutationen von einzelnen Aminosäuren im Bereich der letzten zehn C-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 verändern bis auf -RKRP\_A (Prolin 387 zu Alanin) die Expression des multimeren Reporters an der Plasmamembran in geringem Maße. CD4pLI-RKRP\_A zeigt einen verstärkten Vorwärtstransport. Proline spielen bei den kanonischen internen 14-3-3-Bindemotiven (Mode-I und Mode-II) eine strukturelle Rolle (Coblitz et al, 2006), indem sie das Peptid durch Biegung aus der 14-3-3-Bindungstasche herausführen. Einigen Membranproteinen gemein ist die Abhängigkeit von der Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs. 14-3-3-Proteine binden spezifisch an phosphorylierte Serin- oder Threoninreste der Transportproteine (Kuwana et al, 1998; O'Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002). Die Mutation einzelner, mehrerer oder aller Serine stromabwärts der RKR-Sequenz konnten den Oberflächentransport der Kir6.2 Reporter nicht verhindern und untermauern damit die schon zuvor postulierte Phosphorylierungs-Unabhängigkeit der Interaktion zwischen Kir6.2 Reporterproteinen und 14-3-3-Proteinen (Yuan et al, 2003).

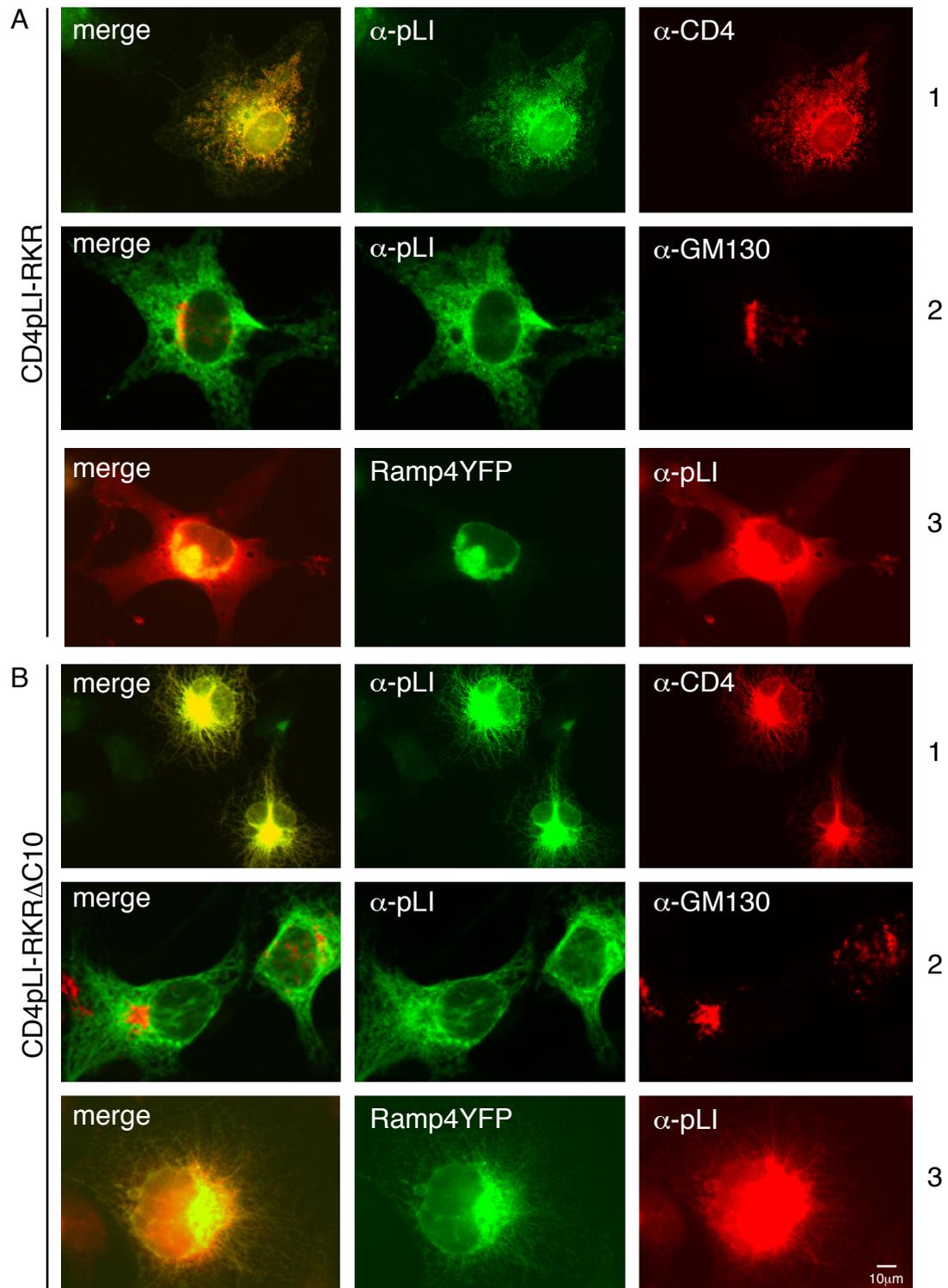


**Abbildung 21: Mutationen im Kir6.2-C-Terminus stromabwärts des Arginin-Signals verändern die Oberflächenexpression von Reporterproteinen in geringem Maße.** (A) Cartoon des tetrameren Membranreporters CD4pLI und Aminosäuresequenz der letzten 36 C-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 und seinen Mutations- bzw. Trunktationsvarianten. (B) Oberflächenexpression von Fusionsproteinen aus CD4pLI und den oben aufgelisteten 36T-Varianten von Kir6.2 in COS-1-Zellen. 24h nach der transienten Transfektion mit den Fusionsproteinen wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte wurden normalisiert auf die Werte von CD4pLI-AAA (n=6).

### 2.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbung von CD4pLI-RKR- und CD4pLI-RKR $\Delta$ C10-

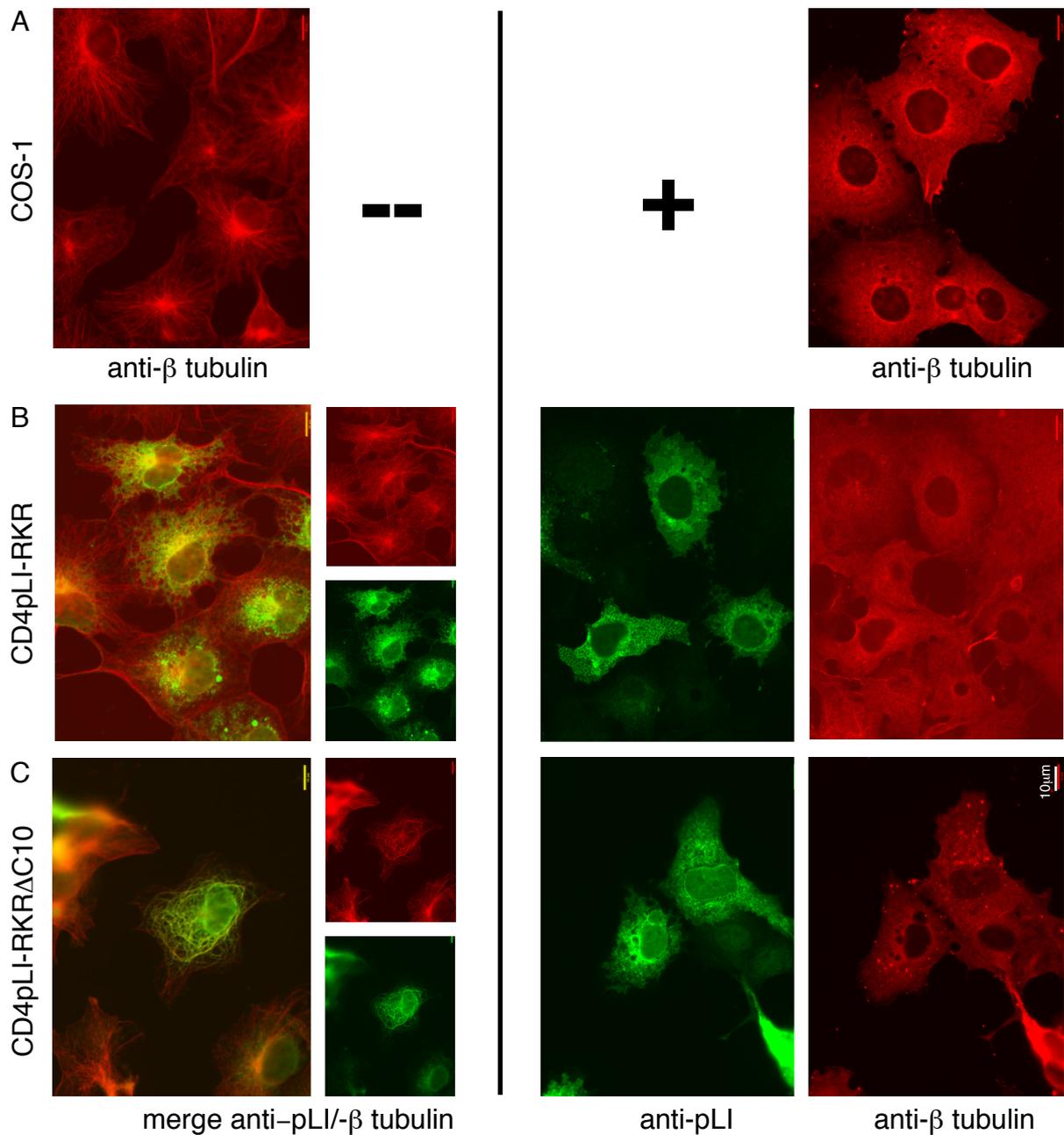
#### Reporterproteinen

Der C-Terminus von Kir6.2, fusioniert an monomeres CD4, bedingt die intrazelluläre Retention des Glykoproteins aufgrund der ER-Lokalisationsaktivität des Arginin-Signals (Heusser und Yuan et al, 2006; Yuan et al, 2003; Zerangue und Schwappach et al, 1999). Werden die Kir6.2-Schwänze in multimerer Form exprimiert (CD4pLI-RKR), kann der Membranreporter mit 14-3-3-Proteinen interagieren und gelangt an die Zelloberfläche (Heusser und Yuan et al, 2006; Yuan et al, 2003). Ein anderes Bild ergibt die Deletion der letzten zehn Aminosäuren von Kir6.2 (RKR $\Delta$ C10). Weder die Fusion an monomeres CD4 noch die an tetrameres CD4pLI ermöglichen dieser Trunkation den effizienten Transport zur Plasmamembran (Heusser und Yuan et al, 2006). Um zu sehen, wo genau in der Zelle diese Kir6.2-Variante zurückgehalten wird, wurden COS-1-Zellen transient mit CD4pLI-RKR und CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 transfiziert. 24h später wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Abbildung 22 zeigt die mikroskopische Analyse der exprimierten Proteine, die über fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper (Alexa-594 bzw. Alexa-488) oder über eigenständig fluoreszierendes YFP sichtbar gemacht wurden. Sowohl Zellen mit CD4pLI-RKR (A) als auch mit CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 (B) wurden mit Antikörpern gegen pLI, gegen CD4 und gegen das Golgi-Matrix-Protein GM130 gefärbt. Weiterhin wurden die Reporterkonstrukte zusammen mit dem ER-residierenden Protein Ramp4, fusioniert an YFP, exprimiert. CD4pLI-RKR (A) lokalisiert überwiegend in retikulären ER-Strukturen, aber auch an der Plasmamembran. Eine Kolo-kalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 ist nicht auszumachen (A 2). Ein anderes Bild zeigen die Kofärbungen der Zellen, die mit CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 transfiziert worden sind (B). Das Reporterprotein lokalisiert zwar auch mit dem ER-Protein Ramp4 (B 3) und nicht mit GM130 (B 2), aber das ER weist eine ungewöhnliche filamentäre Morphologie auf (B 1-3).



**Abbildung 22: Reporterprotein CD4pLI mit Kir6.2-Trunktionsvariante -RKR $\Delta$ C10 lokalisiert in filamentären ER-Strukturen.** Immunfluoreszenz von COS-1-Zellen, transient transfiziert mit den Reporterproteinen CD4pLI-RKR ((A)1-3) oder CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 ((B)1-3) bzw. den Reporterproteinen zusammen mit der ER-Protein Ramp4-YFP ((A) 3 und (B) 3). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen das Golgi-Matrix-Protein GM130 (*cis* Golgi), die Coiled-Coil-Strukturen-bildende Domäne pLI und das Glykoprotein CD4 gefärbt. Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Zweitantikörper (rot und grün) ermöglichten die Detektion im Mikroskop. YFP (Gelb-fluoreszierendes Protein) ist hier grün wiedergegeben, da es im GFP(Grün-fluoreszierendes Protein)-Kanal besser leuchtete. Die Bilder links (merge) stellen die Überlagerung der Kofärbungen dar.

Um diese stark an Mikrotubuli erinnernden filamentären Strukturen genauer unter die Lupe zu nehmen, wurden COS-1-Zellen erneut mit den beiden Reportern transfiziert und vor der Fixierung mit (+) oder ohne (-) Nocodazol behandelt (Abbildung 23). Das Gift Nocodazol depolymerisiert Mikrotubuli in einzelne Tubulin-Untereinheiten. Zur Sichtbarmachung der Mikrotubuli wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin gefärbt, die Reporterproteine wurden über anti-pLI-Antikörper detektiert. Die Tubulin-Färbung nicht-transfizierter COS-1-Zellen ohne und mit Nocodazol belegt die Effizienz der Depolymerisierung. Während CD4pLI-RKR in Zellen nach Nocodazol-Behandlung das gleiche Lokalisationsmuster aufweist wie in Zellen, deren Mikrotubuli intakt sind, verändert sich das Bild für CD4pLI-RKR $\Delta$ C10. Die filamentären (ER)-Strukturen, die in unbehandelten Zellen eindeutig mit Mikrotubuli-Strukturen koloalisieren, sind in Nocodazol-behandelten Zellen nicht mehr auszumachen. Das Protein lokalisiert hier wie CD4pLI-RKR in retikulären ER-Strukturen. Die enge Verbindung zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und zytoskelettalen Mikrotubuli ist seit langem bekannt (Terasaki et al, 1986) und neben den von Tubulin-Proteinen gebildeten Mikrotubuli wird auch das Motorprotein Kinesin-1 zu den essentiellen Determinanten für Entstehung und Aufrechterhaltung der ER-Struktur gezählt (Feiguin et al, 1994; Ebneith et al, 1998). Neuere Daten verweisen zudem auf Nicht-Motorproteine, die ebenfalls ER-morphogen wirken. So zeigen Zellen, in denen das „cytoskeleton-linking ER membrane protein“ CLIMP-63 überexprimiert wird, Strukturen, die den mit CD4pLIRKR $\Delta$ C10 beobachteten ER-Mikrotubuli-Bündeln stark ähneln (Klopfenstein et al, 1998). Aber nicht nur Proteine, die das ER mit Mikrotubuli verbinden, können solche Strukturen erzeugen, die ER-Struktur kann generell auch schon allein durch die Überexpression von Proteinen artifiziell verändert werden (Vedrenne und Hauri, 2006).



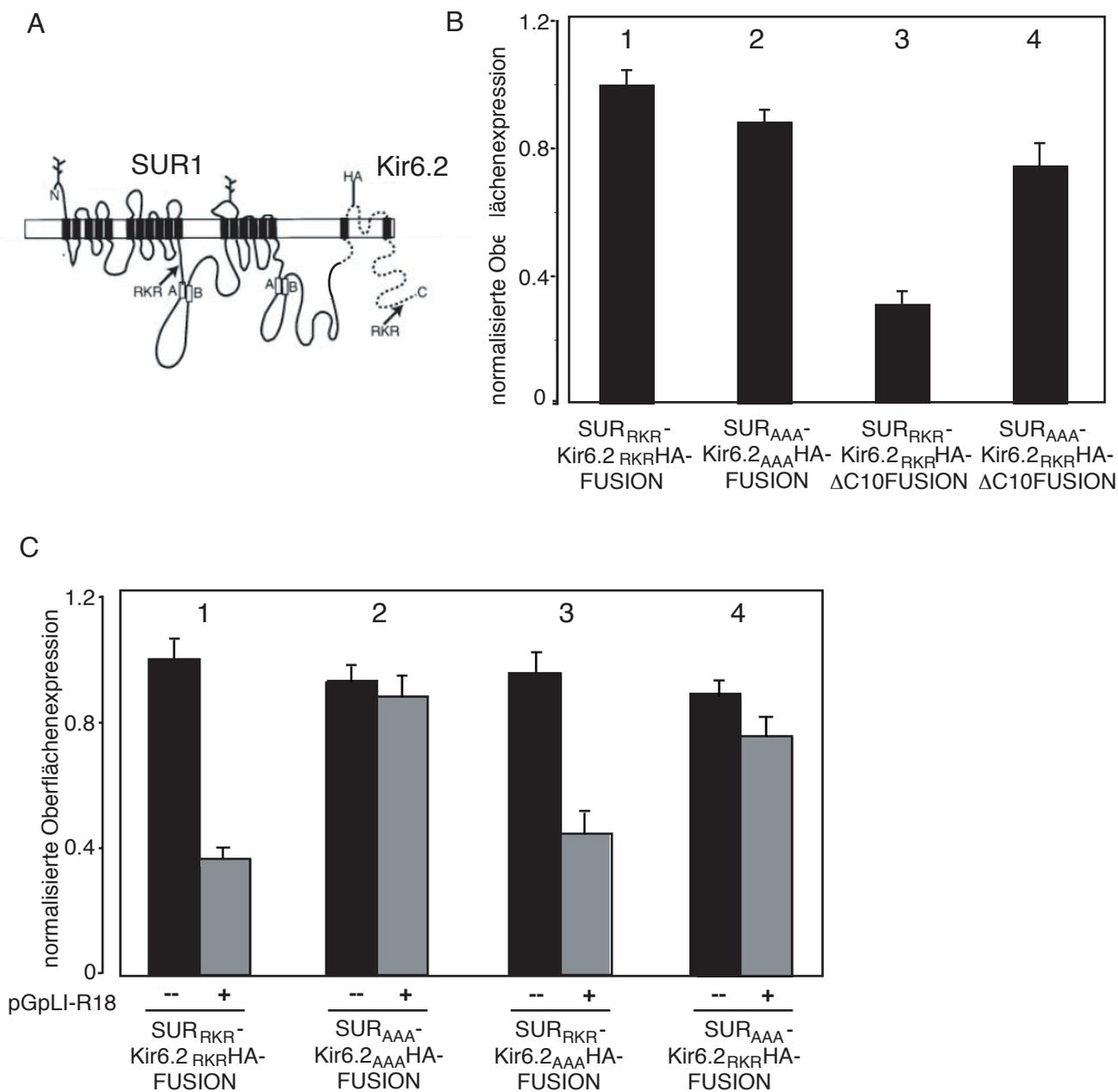
**Abbildung 23: Filamentäre ER-Strukturen sind abhängig von intakten Mikrotubuli.** Immunfluoreszenz von COS-1 Zellen, nicht transfiziert (A) oder transient transfiziert mit den Reportern CD4pLI-RKR (B) oder CD4pLI-RKRΔC10 (C). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit (+, rechts) oder ohne (-, links) dem Mikrotubuli-depolymerisierenden Gift Nocodazol behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen die Coiled-Coil-Domäne pLI und β-Tubulin gefärbt. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper ermöglichten die Detektion im Mikroskop (rot und grün).

## 2.2.4 Oberflächenexpression von $K_{ATP}$ -Fusionsproteinen

### 2.2.4.1 Einfluss von Verkürzungen des Kir6.2-Carboxyterminus auf $K_{ATP}$ -Kanäle

Von allen bisher untersuchten CD4pLI-Kir6.2-Reporterproteinen erscheint die Variante RKR $\Delta$ C10 am ehesten dazu geeignet, übertragen auf ein dem nativen  $K_{ATP}$ -Kanal sehr ähnliches Fusionsprotein, Aufschluss über den Zusammenhang zwischen 14-3-3-Proteinen und  $K_{ATP}$ -Kanälen geben zu können. Da CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 ein aktives ER-Lokalisationssignal präsentiert, aber weniger 14-3-3-Proteine binden kann und in Folge dessen auch nicht an die Zelloberfläche transportiert werden kann, stellt es eine Variante dar, bei der die Kopplung von COPI-Bindung (ER-Lokalisation) und 14-3-3-Bindung (Oberflächentransport) aufgehoben ist. RKR $\Delta$ C10 ermöglicht, die Konsequenzen der reduzierten 14-3-3-Bindung an Kir6.2 im Kontext funktioneller  $K_{ATP}$ -Kanalproteine zu untersuchen, ohne die Wirkung des RKR-Sequenz als ER-Lokalisationssignal zu beeinträchtigen. Im Folgenden wurde RKR $\Delta$ C10 in ein SUR1-Kir6.2-Fusionsprotein eingefügt, bei dem der C-Terminus von SUR1 an den N-Terminus von Kir6.2 fusioniert ist (Abbildung 24 (A)). Produkte dieser Tandem-Fusion sind funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle oktamerer Stöchiometrie (Clement et al, 1997; Shyng und Nichols, 1997). Exprimiert man Kir6.2 und SUR1 alleine, lokalisieren sie aufgrund des Arginin-Signals im ER (Zerangue und Schwappach et al, 1999). Kir6.2 kann zwar Tetramere ausbilden, diese verbleiben jedoch im Zellinneren, was darauf hindeutet, dass die Koassemblierung von Kir6.2-Untereinheiten nicht zur Maskierung der ER-Lokalisationssignale führt. Nur in Anwesenheit von SUR1 kann Kir6.2 an die Oberfläche gelangen, können Arginine-enthaltende ER-Lokalisationssignale inaktiviert werden. Die Tatsache, dass 14-3-3-Proteine spezifisch an RKR-Signale binden und  $K_{ATP}$ -Kanäle weniger an die Plasmamembran transportiert werden, wenn die Menge an zur Verfügung stehendem 14-3-3-Protein reduziert wird (Scavenging von 14-3-3, Abbildung 14 (B)), impliziert den Beitrag der 14-3-3-Bindung zum Vorwärtstransport und folglich die notwendige Zugänglichkeit der RKR-Motivs in SUR1 oder Kir6.2.

Fusionsproteine mit aktiven bzw. inaktiven ER-Lokalisationssignalen, mit oder ohne trunkierten Kir6.2-C-Terminus wurden transient in COS-1-Zellen transfiziert und 24h später über eine extrazelluläre Hämagglutinin (HA-) Markierung von Kir6.2 an der Zelloberfläche luminometrisch detektiert (Abbildung 24 (B)). Da in den Tandemfusionen SUR<sub>RKR</sub>-Kir6.2<sub>RKR</sub> und SUR<sub>AAA</sub>-Kir6.2<sub>AAA</sub> beide Kanal-Untereinheiten vorhanden sind, erreichen diese unabhängig von der Anwesenheit aktiver ER-Lokalisationssignale effizient die Zelloberfläche ((B) 1+2). Im Vergleich dazu zeigt der  $K_{ATP}$ -Kanalkomplex SUR<sub>RKR</sub>-Kir6.2<sub>RKR $\Delta$ C10</sub> mit aktiven ER-Lokalisationssignalen und trunkiertem Kir6.2-Schwanz eine um die Hälfte reduzierte Oberflächenpräsenz ((B) 3). Wird



**Abbildung 24: C-terminale Trunkation von Kir6.2 beeinflusst die Präsenz des  $K_{ATP}$ -Kanals an der Zelloberfläche.** (A) Cartoon des Fusionsproteins SUR1-Kir6.2HA (aus Zerangue und Schwappach et al, 1999) (B) Oberflächenexpression von SUR1-Kir6.2-Fusionsproteinen mit aktiven und inaktiven RKR-Signalen und der -RKRΔC10-Variante von Kir6.2, transient transfiziert in COS-1-Zellen. 24h nach der transienten Transfektion mit den Fusionsproteinen wurden die Zellen fixiert und mit einem Hämagglutinin(HA) -Antikörper gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte wurden normalisiert auf Expression des „Wildtyp“ Fusionskanals (n=9) (siehe auch Heusser und Yuan et al, 2006) (C) RKR-Signale spielen eine Rolle beim Vorwärtstransport von  $K_{ATP}$ -Kanälen. Oberflächenexpression in *Xenopus* Oocyten von SUR1-Kir6.2HA-Fusionsproteinen mit aktiven und mutierten (inaktiven) RKR-Signalen, in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (--) des Scavengerproteins pGpLIR18 (siehe auch Abbildung 14). Oocyten wurden fixiert und mit Antikörpern gegen HA gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenexpression in einem Luminometer. Die Werte sind normalisiert auf die Oberflächenexpression des „Wildtypproteins“ in Abwesenheit von pGpLIR18 (n>90). (Daten von Ioana Neagoe in: Heusser und Yuan et al, 2006)

jedoch das ER-Lokalisationssignal von SUR1 durch Alanine inaktiviert ( $\text{SUR}_{\text{AAA}}\text{-Kir6.2}_{\text{RKR}\Delta\text{C10}}$ ), kann der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal wieder effizienter vorwärts transportiert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Bindung von 14-3-3 an Kir6.2 antagonistisch auf das RKR-Signal von SUR1 wirkt.

#### 2.2.4.2 Wirkung eines 14-3-3 Scavengerproteins auf die Oberflächenexpression von $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen

Komplementäre Experimente wurden in unbefruchteten *Xenopus*-Oocyten durchgeführt (Abbildung 24 (C); Daten von Ioana Neagoe in: Heusser und Yuan et al, 2006)). Im Gegensatz zu den Versuchen in Säugerzellen wurde hier der schon zuvor erfolgreich getestete „Scavenger“ pGpLIR18 eingesetzt, um den Einfluss der 14-3-3-Proteine auf den Transport des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals an die Oberfläche zu untersuchen. Die zuvor beschriebenen Fusionsproteine mit aktiven ( $\text{SUR}_{\text{RKR}}\text{-Kir6.2}_{\text{RKR}}$ ) oder inaktiven ( $\text{SUR}_{\text{AAA}}\text{-Kir6.2}_{\text{AAA}}$ ) ER-Lokalisationssignalen wurden alleine (-) oder zusammen mit (+) dem Scavenger in den Oocyten exprimiert. Über den HA-Marker in Kir6.2 konnte die Anwesenheit der Proteine an der Zelloberfläche luminometrisch bestimmt werden. Weisen beide  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Untereinheiten funktionelle ER-Lokalisationssignale auf, reagieren die Kanäle empfindlich auf den Abzug von 14-3-3-Proteinen und zeigen eine stark reduzierte Oberflächenexpression (Abbildung 24 (C) 1). Sind hingegen die RKR-Signale in beiden Untereinheiten mutiert, spielt die Anwesenheit der 14-3-3-Proteine keine Rolle ((C) 2). Ergebnisse früherer Untersuchungen an SUR1-Kir6.2 Fusionsproteinen deuteten darauf hin, dass das Arginin-Signal von SUR1 im funktionell assemblierten Komplex partiell exponiert ist (Zerangue und Schwappach et al, 1999). Um zu unterscheiden, welches der ER-Lokalisationssignale, das in SUR1 oder das in Kir6.2, verantwortlich für die 14-3-3-Bindung und den beobachteten Scavenger-Effekt ist, wurden Fusionsproteine untersucht, in denen entweder das Signal in der einen ( $\text{SUR}_{\text{RKR}}\text{-Kir6.2}_{\text{AAA}}$ ) oder aber in der anderen ( $\text{SUR}_{\text{AAA}}\text{-Kir6.2}_{\text{RKR}}$ )  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Untereinheit mutiert ist (Abbildung 24 (C) 3+4). Die Mutation des Kir6.2-RKR-Signals veränderte die Sensitivität gegenüber der 14-3-3 Reduktion nicht ((C) 3), im Gegensatz dazu machte eine Mutation des ER-Lokalisationssignals von SUR1 den Kanal unempfindlich gegenüber Abwesenheit von 14-3-3-Proteinen ((C) 4). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass im assemblierten  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Komplex zum einen das RKR-Signal von Kir6.2 unzugänglich ist (Zerangue und Schwappach et al, 1999), zum anderen 14-3-3-Proteine die Wirksamkeit des ER-lokalisierenden Signals in der SUR1 Untereinheit reduzieren.

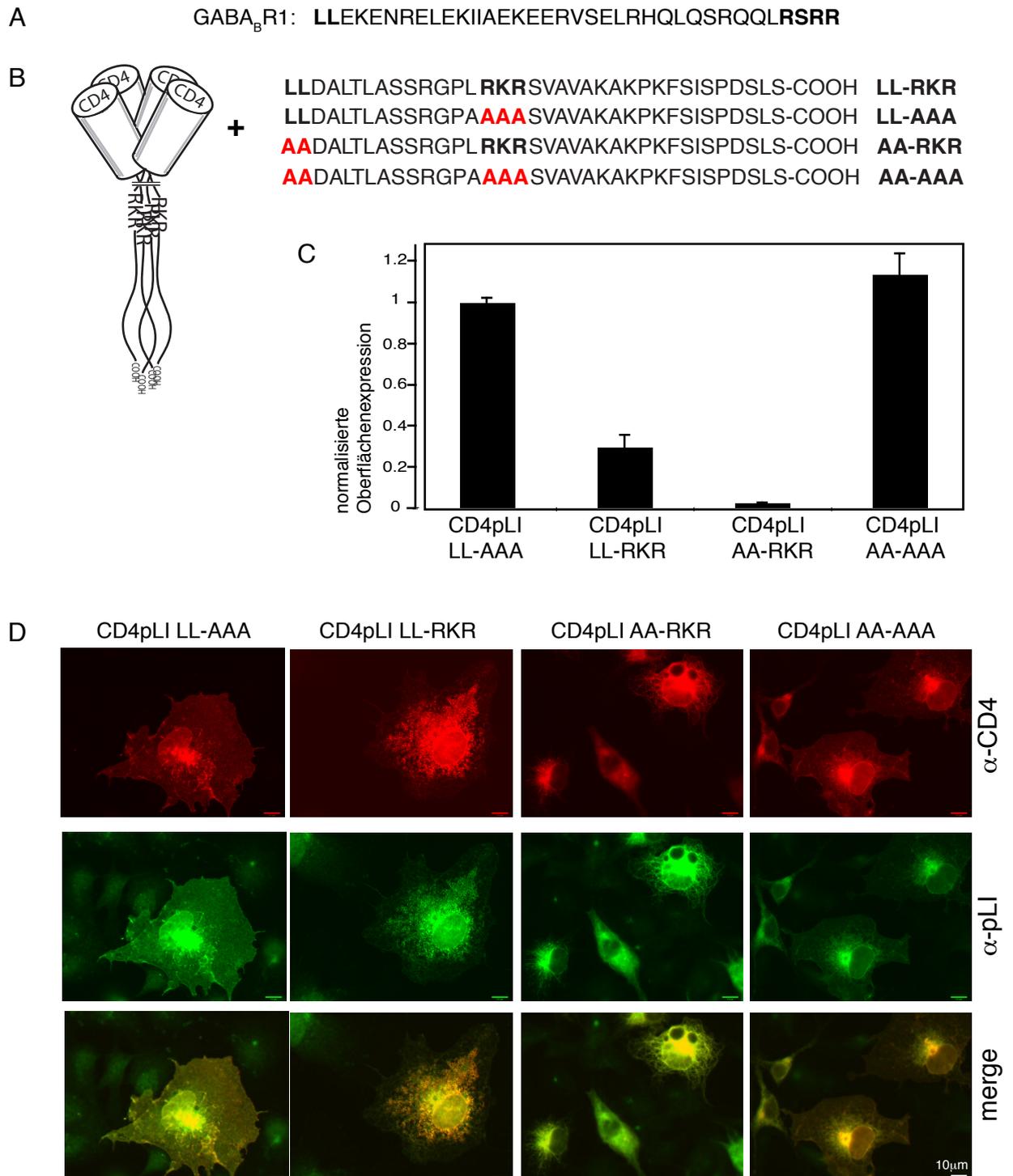
## 2.3 Multiple Motive im Kir6.2 C-Terminus

Di-Leucin-(DxxLL/[DE]xxxL[LI]) und Tyrosin-haltige (YxxΦ/NPxY) Signale gehören zu den endosomal-lysosomalen Sortierungssignalen und sind in diversen Membranproteinen zu finden (Bonifacino und Traub, 2003). Sie vermitteln sowohl die Internalisierung als auch den Weg zu den Lysosomen oder vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Endosomen. Man geht davon aus, dass die Proteine über diese Motive direkt oder indirekt an Clathrin-assoziierte Adaptor-Protein(AP)-Komplexe binden. Während Tyrosin-haltige Motive die  $\mu$ 2 Untereinheit des AP-2 Komplexes binden, werden LL-Signale vornehmlich von der VHS-Domäne der Golgi-assoziierten,  $\gamma$ -Adaptin-homologen, ARF-bindenden(GGA)-Proteine erkannt (Bonifacino und Traub, 2003).

Die GABA<sub>B</sub>R1 (GB1)-Untereinheit des neuronalen  $\gamma$ -Aminobuttersäure Typ B Rezeptors GABA<sub>B</sub> verzeichnet in ihrem C-Terminus sowohl ein LL-Signal als auch ein Arginin-haltiges (RSRR)-ER-Lokalisationssignal (Abbildung 25 (A)). Diese Untereinheit des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, der im Gehirn die Inhibierung durch  $\gamma$ -Aminobuttersäure vermittelt, wird im Zellinneren zurückgehalten, wenn sie nicht zusammen mit der anderen Untereinheit GABA<sub>B</sub>R2 (GB2) ein Heterodimer bilden kann (Couve et al, 2000). Inaktiviert man das ER-Lokalisationssignal RSRR durch Mutation (GB1<sub>ASRR</sub> oder GB1<sub>ASAR</sub>), kann GB1 auch alleine die Zelloberfläche erreichen, Mutation des LL-Signals alleine verändert die Lokalisation im Zellinneren jedoch nicht (Margeta-Mitrovic et al, 2000; Restituto et al, 2005). Eine Kombination der Mutationen in GB1<sub>AA-ASRR</sub> erlaubt der Untereinheit den Zutritt zur Plasmamembran weitaus effizienter als die Mutation des ER-Lokalisationssignals alleine, was dafür spricht, dass LL- und Arginin-haltige Motive in Koordination die Oberflächenexpression von GB1 Rezeptoren regulieren (Restituto et al, 2005). Restituto et al konnten unter Verwendung verschiedener Methoden beweisen, dass das LL-Signal weder eine regulatorische Rolle bei der Endozytose der GB1 Untereinheit noch für die Stabilität des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors spielt. Das LL-Motiv scheint hier nicht als Endozytose-Signal zu fungieren, sondern vielmehr den Transport des Rezeptors im sekretorischen Weg zu kontrollieren. Möglicherweise kontrolliert die RSRR-Sequenz die ER-Retention der GB1 Untereinheit, während das LL-Signal darauf folgende Transportereignisse moduliert.

### 2.3.1 Einfluss des LL-Signals auf die Oberflächenpräsenz von Kir6.2-Reporterproteinen

Ebenso wie GB1 weist der C-Terminus von Kir6.2 sowohl ein Arginin-haltiges ER-Lokalisationssignal (RKR) als auch stromaufwärts ein LL-Signal auf (Zerangue und Schwappach et al, 1999). Diese Sequenzhomologien sowie die Tatsache, dass GB1 ebenso wie Kir6.2 sowohl 14-3-3-Proteine als auch COPI bindet (Couve et al, 2001; Brock et al, 2005), sind Grund genug, den Einfluss des LL-Signals in Kir6.2 zu untersuchen. Hierfür wurde sich des vorher beschriebenen tetrameren Membranreporters CD4pLI bedient und an Mutations-Varianten des Kir6.2-C-Terminus fusioniert (Abbildung 25 (B)). Die „Wildtyp“-Variante enthält sowohl ein intaktes LL- als auch ein RKR-Signal (LL-RKR), weitere Varianten weisen eine Mutation eines der Signale auf (AA-RKR bzw. LL-AAA) oder eine Mutationskombination (AA-AAA). Diese Reporterproteine wurden transient in COS-1-Zellen transfiziert und 24h später die Oberflächenpräsenz von CD4 nach Antikörperfärbung chemilumineszent bestimmt (Abbildung 25 (C)). Während die Mutation des Arginin-Signals alleine (LL-AAA) eine stärkere Oberflächenpräsenz verursacht als die „Wildtyp“-Form mit aktivem ER-Lokalisationssignal (LL-RKR), bewirkt die Mutation des LL-Signals alleine eine vollkommene Retention des Reporters im Zellinneren (AA-RKR). Die Mutation des LL-Motivs in AA-AAA wirkt noch verstärkend auf die durch Mutation des ER-Lokalisationssignals bedingte Exposition an der Plasmamembran. Wie bei GB1 verursacht die Mutation des LL-Signals eine Veränderung der Oberflächenexpression der Kir6.2-Reporterproteine. Während bei GB1 kein Unterschied zwischen der Expression des „Wildtyp“-GB1<sub>LL\_RSRR</sub> und der LL-Mutante GB1<sub>AA\_RSRR</sub> auszumachen ist (da auch die Wildtyp-Form vollkommen intrazellulär retentiert vorliegt), die Kombination aus beiden Mutationen GB1<sub>AA\_ASAR</sub> aber im Vergleich zur GB1<sub>LL\_ASAR</sub> deutlich verstärkt an die Plasmamembran transportiert wird (Restituto et al, 2005; Margeta-Mitrovic et al, 2000), zeigt sich bei CD4pLI-AA-RKR schon ein großer Unterschied zu CD4pLI-LL-RKR (da die „Wildtyp“-Form an die Oberfläche kommt) und der Unterschied zwischen CD4pLI-LL-RKR und CD4pLI-AA-AAA ist nicht ganz so ausgeprägt. Die Veränderung der LL-Sequenz in Kir6.2 beeinflusst möglicherweise die Interaktion mit der Maschinerie des Vorwärtstransportes, entweder durch die direkte Zerstörung einer Bindungsstelle oder aber durch indirekte Störung anderer weiter stromaufwärts oder stromabwärts gelegener Bindestellen von Interaktionspartnern. Dieser Effekt ist jedoch abhängig von der Anwesenheit eines aktiven RKR-Signals, da CD4pLI-AA-AAA sehr effizient an die Zelloberfläche transportiert wird.



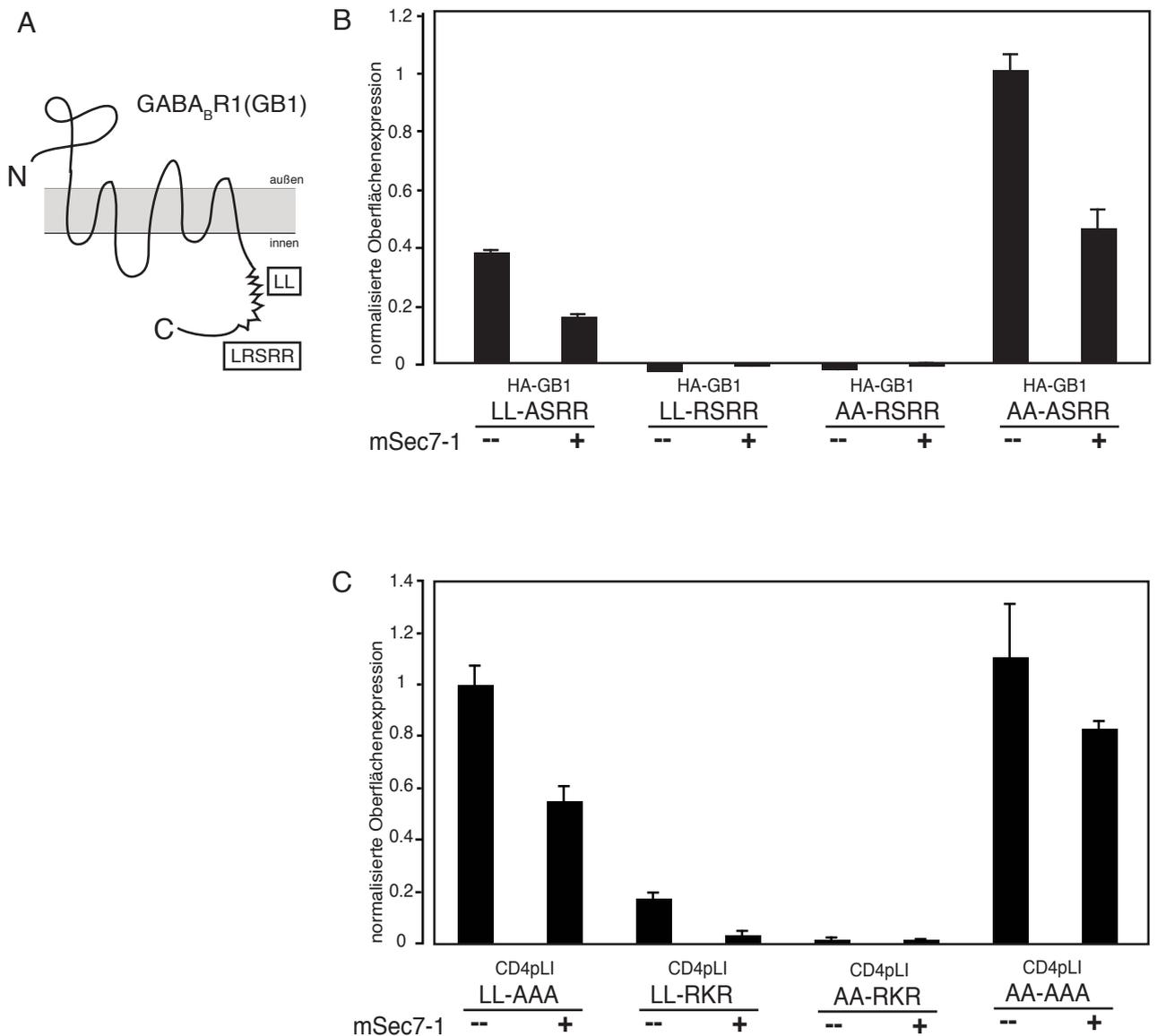
**Abbildung 25: LL-Signal stromaufwärts der Arginin-Sequenz beeinflusst den Transport des Reporterproteins CD4pLI-RKR zur Plasmamembran.** (A) C-Terminaler Sequenzabschnitt der R1-Untereinheit des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Typ-B-Rezeptors GABA<sub>B</sub>, vom LL-Signal bis zum RSRR-Signal (B) Sequenz der letzten 36 C-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 und seinen Mutanten (rote AS), fusioniert an den Membranreporter CD4pLI. (C) Messung der Oberflächenexpression der verzeichneten Reporterproteine, transient transfiziert in COS-1-Zellen. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper ermöglichten die Messung im Luminometer (n=9). (D) Immunfluoreszenz von COS-1-Zellen, transient transfiziert wie in (C). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das Oberflächenprotein CD4 (obere Reihe) und die Coiled-Coil-Domäne pLI (mittlere Reihe) gefärbt. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper ermöglichten die Proteindetektion im Mikroskop (rot und grün). Die untere Reihe stellt die Überlagerung (merge) der Färbungen dar.

Abbildung 25 (D) zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von COS-1-Zellen, transient transfiziert wie in (C) und mit Antikörpern gegen CD4 (oberer Reihe) bzw. pLI (untere Reihe) gefärbt. Beide Färbungen bestätigen die Ergebnisse des Oberflächenversuchs, die starke Oberflächenpräsenz der Reporter mit –LL-AAA und –AA-AAA, die Lokalisierung von –LL-RKR an der Plasmamembran sowie im retikulären ER und die ausgeprägte ER-Lokalisation der Variante –AA-RKR. Interessanterweise zeigt CD4pLI-AA-RKR die gleichen filamentären, an Mikrotubuli erinnernden ER-Strukturen wie die in vorherigen Experimenten untersuchte Trunktationsvariante CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 (Abbildung 22 (B)).

### 2.3.2 Einfluss des Guanin-Nukleotidaustauschers mSec7-1 auf den Oberflächentransport von Kir6.2-Reporterproteinen und GABA<sub>B</sub>R1-Varianten

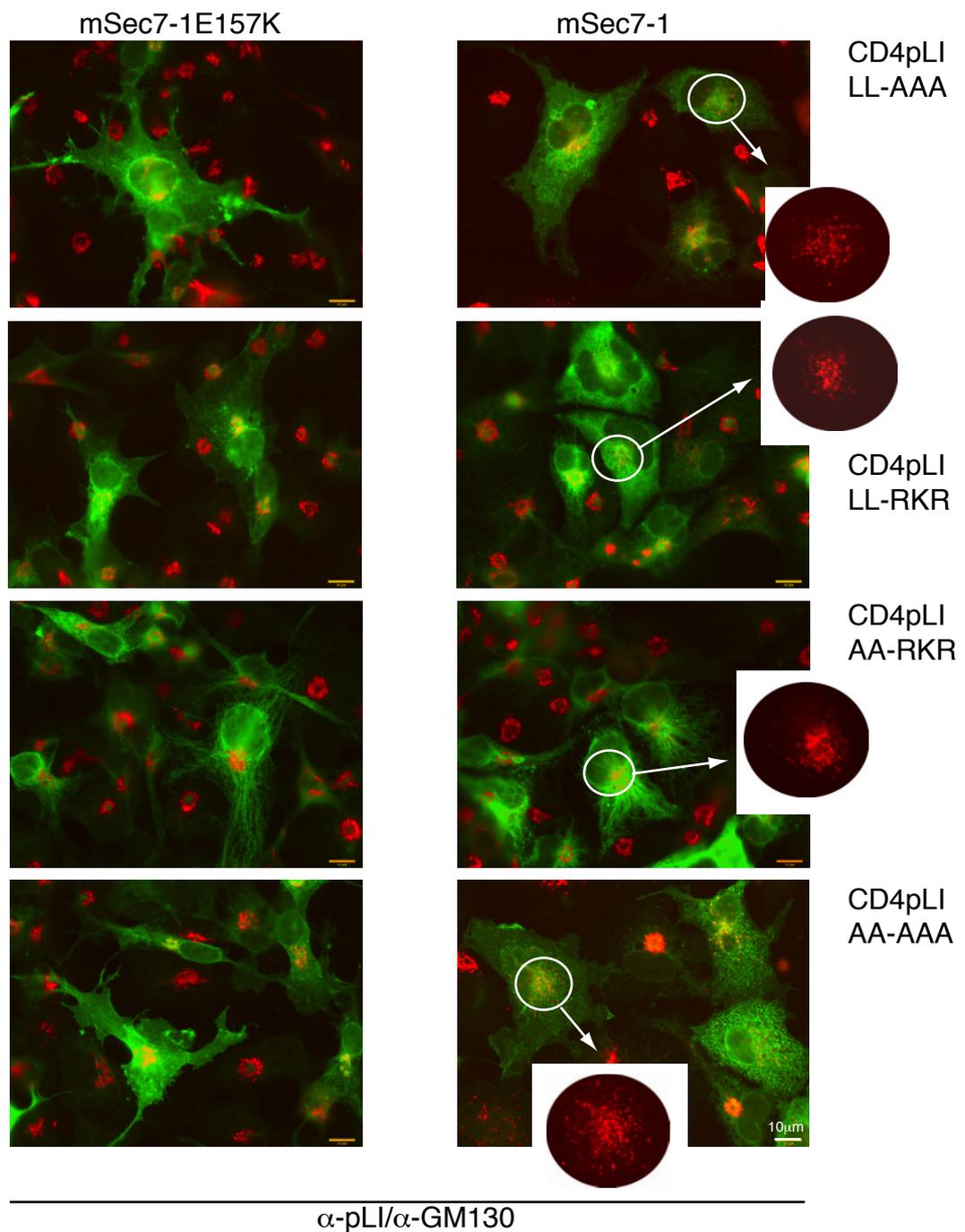
Das Protein mSec7-1, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für verschiedene ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF), wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit dem C-Terminus von GB1 als Interaktionspartner identifiziert (Restituito et al, 2005). ARF Proteine sind wichtige Regulatoren von Membrandynamik und Proteintransport in der eukaryotischen Zelle (Jackson und Casanova, 2000). mSec7-1 kann verschiedenen ARF-Proteinen als GEF dienen, wobei es die höchste Aktivität bei ARF1, 3 und 6 zeigt. ARF1-3 sind Teil des COPI-Komplexes und des Clathrin-AP1/AP3-Komplexes. Bindungsexperimente mit mSec7-1 und den LL- bzw. RSRR-Mutanten von GB1 konnten die spezifische Interaktion von mSec7-1 mit GB1<sub>LL-RSRR</sub> und GB1<sub>LL-ASAR</sub> belegen (Restituito et al, 2005). Die Effizienz der Bindung von msec7-1 an GB1 hing dabei entscheidend von der Unversehrtheit des LL-Signals ab, konnte GB1<sub>AA-ASAR</sub> nur wenig und GB1<sub>AA-RSRR</sub> mSec7-1 überhaupt nicht binden. Koexpression in Säugerzellen konnte den Transport von GB1<sub>LL-ASAR</sub> an die Zelloberfläche effizient verstärken, aber nicht den von Wildtyp GB1 und GB1<sub>AA-ASAR</sub>, was erneut auf die Bedeutung des LL-Signals verweist.

Aufgrund der schon zuvor genannten Ähnlichkeiten zwischen GB1 und Kir6.2 bezüglich der Sortierungssignale und Interaktionspartner, wurden Oberflächenexperimente mit COS-1-Zellen durchgeführt, die transient mit den verschiedenen HA-markierten GB1-Varianten +/- mSec7-1 (Abbildung 26 (B)) bzw. mit den zuvor analysierten Kir6.2-Varianten +/- mSec7-1 (C) transfiziert worden sind. Der Transport an die Zelloberfläche wurde nach Färbung der Zellen mit anti-HA-Antikörpern (HA-GB1) bzw. anti-CD4 Antikörpern luminometrisch bestimmt. Das Verhältnis der Oberflächenexpression der GB1 Varianten ohne mSec7-1 untereinander entspricht dem publizierten (Margeta-Mitrovic et al, 2000; Restituito et al, 2005). Die Oberflächenexpression unter Koexpression von mSec7-1 reduziert sich jedoch für alle GB1-Varianten (die generell an



**Abbildung 26: Überexpression von GEF mSec7-1 beeinträchtigt den Oberflächentransport von Reporterproteinen unabhängig von LL- oder Arginin-Signalen.** (A) Topologie der Untereinheit GABA<sub>B</sub>R1 des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Typ-B-Rezeptors GABA<sub>B</sub>. Sie enthält sowohl ein LL- als auch ein Arginin-Signal (RSRR). Die gezackte Linie stellt eine Coiled-Coil-Struktur dar. (B) und (C) Messung der Oberflächenexpression in COS-1-Zellen, transient transfiziert mit Hämagglutinin(HA)-markiertem GABA<sub>B</sub>R1 (GB1 in Abb.), zusammen mit (+) oder ohne (-) Guanin-Nukleotid austauschfaktor mSec7-1 (B) bzw. transient transfiziert mit verzeichneten CD4pLI-Reportern, zusammen mit (+) oder ohne (-) mSec7-1 (C). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die Oberflächenexpression wurde chemilumineszent detektiert nach Färbung mit einem Antikörper gegen HA (B) oder gegen CD4 (C) sowie entsprechenden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern. Die Werte wurden normalisiert auf GB1AA-ASRR (B) bzw. auf CD4pLI-LL-AAA (C) (n=3).

die Oberfläche gelangen) auf die Hälfte, unabhängig von Unversehrtheit des LL- oder Arginin-Signals (Abbildung 26 (B)). Das gleiche Phänomen zeigt sich, wenn man die in (C) verzeichneten Kir6.2-Reporter zusammen mit mSec7-1 in COS-1-Zellen exprimiert. Die Präsenz aller Reporterproteine, die generell an die Plasmamembran transportiert werden, verringert sich um die Hälfte. Dies erscheint ebenso unabhängig zu sein von der LL-oder RKR-Sequenz (C). Da sich die Effekte der Koexpression mit mSec7-1 eher unspezifisch negativ auf den Oberflächentransport von zwei verschiedenen Membranproteinen ausgewirkt haben, sollten Immunfluoreszenzanalysen Aufschluss geben über den Verbleib der Kir6.2-Reporterproteine und möglicherweise veränderte Zellstrukturen. Hierfür wurden COS-1-Zellen transient mit den vier Reporterkonstrukten sowie mit mSec7-1 bzw. mSec7-1E157K transfiziert. Die Mutation in mSec7-1E157K bewirkt eine stark reduzierte GEF-Aktivität (Huh et al, 2003) und eignet sich daher als Kontrolle für die Koexpression von Membranreportern und einem aktiven GEF. Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen GM130 (*cis* Golgi) und gegen die Coiled-Coil Domäne pLI gefärbt (Abbildung 27). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen die Überlagerungen der Kofärbungen von Zellen, die mit den rechts verzeichneten Reporterkonstrukten sowie mit mSec7-1E157K (linke Spalte) oder mSec7-1 (rechte Spalte) transfiziert worden sind. Die Vergrößerungen (große Kreise) sind Ausschnitte des GM130-markierten- (Golgi-)Bereichs von ausgewählten Zellen (kleine weiße Kreise). Die Aufnahmen bestätigen die im Oberflächenassay gemachten Beobachtungen der Reduktion der Expression der Reporter an der Plasmamembran unter gleichzeitiger Expression von mSec7-1. Zellen, die das GEF-Protein und die CD4pLI-Konstrukte koexprimieren, weisen eine veränderte Golgi-Struktur auf (Vergrößerungen). Der von anti-GM130 Antikörpern markierte (*cis*-) Golgi erscheint weniger kompakt und mehr in einzelne kleinere Vesikel aufgeteilt als in Zellen, die mSec7-1E157K oder gar kein GEF überexprimieren. Während die Reporter CD4pLI-LL-AAA, -LL-RKR, -AA-AAA unter mSec7-1-Überexpression (durch die Veränderung der Golgi-Struktur) allesamt weniger an die Zelloberfläche transportiert werden und mehr im Zellinneren akkumulieren, wirken die schon zuvor beobachteten filamentären ER-Strukturen des CD4pLI-AA-RKR Reporters eher unbeeinflusst von der mSec7-1-Koexpression. Die von Restituto et al festgehaltenen Befunde der spezifischen Wirkung des GEF mSec7-1 auf die LL-Signale von GB1, der verstärkte Transport an die Zelloberfläche von GB1 mit intaktem LL-Signal, aber inaktivem Argininsignal unter Koexpression von mSec7-1, konnte weder reproduziert noch auf Kir6.2-Reporter übertragen werden.



**Abbildung 27: Überexpression von GEF mSec7-1 verändert die Golgi-Struktur und stört den Vorwärtstransport von Reporterproteinen unabhängig von LL- und RKR-Signalen.** Immunfluoreszenz von COS-1 Zellen, transient transfiziert mit den rechts verzeichneten Kir6.2- Reporterproteinen zusammen mit dem Guanin-Nukleotidaustauscher mSec7-1 (rechts) bzw. mit seiner Mutante mSec7-1-E157K (links). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen pLI (Coiled-Coil) sowie gegen GM130 (*cis*-Golgi) gefärbt. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper (rot und grün) ermöglichten die Detektion der Proteine im Mikroskop. Die großen Kreise rechts im Bild zeigen die Vergrößerung der Golgi-Färbung ausgewählter Zellausschnitte (kleine weiße Kreise).

## 2.4 Sortierungssignale und Vorwärtstransport von K2P-Kanälen

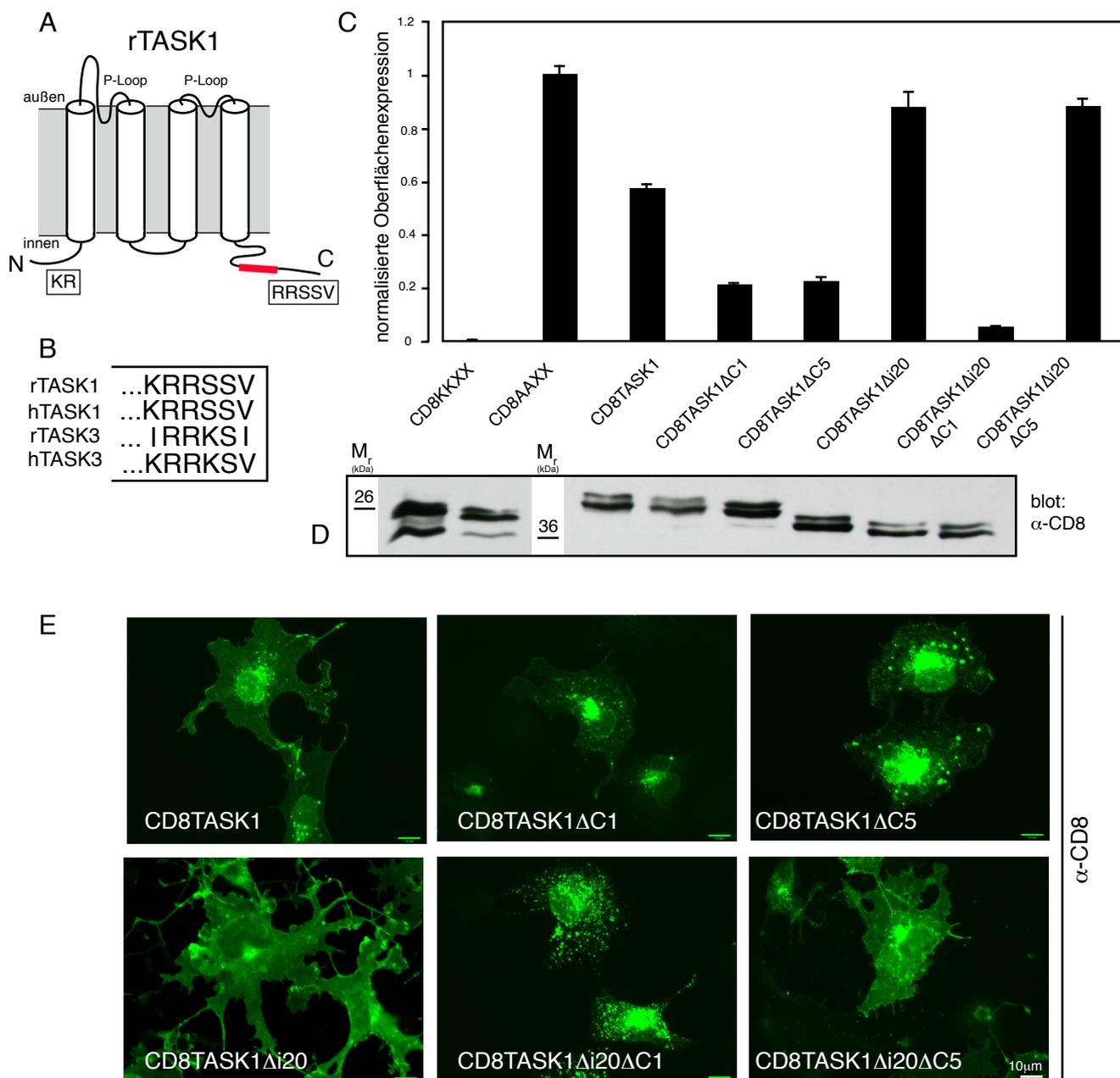
TASK1 (K2P3) und TASK3 (K2P9) gehören zur Familie der Zwei-Poren-K<sup>+</sup>-Kanäle und werden von zwei Untereinheiten gebildet, von denen jede aus zwei Poren-bildenden Proteinbereichen (P-loops) und vier Transmembransegmenten besteht (Plant et al, 2005) (siehe Einleitung Abbildung 4). Wie alle K2P-Kanälen weisen TASK-Proteine intrazellulär einen kurzen N- und einen langen C-Terminus auf, die beide diverse Sortierungssignale beherbergen (Rajan et al, 2002). So haben verschiedene Studien an TASK1 (Abbildung 28 (A)) und TASK3 (Abbildung 29 (A)) gezeigt, dass ihr Erscheinen an der Zelloberfläche von gegensätzlich wirkenden Transportmotiven abhängt, die von intrazellulären Bindungspartnern erkannt werden (O'Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002; Renigunta et al, 2006). Ein N-terminales KR-Motiv wird von dem Coatomer-Protein  $\beta$ -COP erkannt und ist verantwortlich für die ER-Lokalisation (O'Kelly et al, 2003). Der Transport an die Plasmamembran erfolgt nur, wenn die vorletzte Aminosäure des TASK1- und TASK3-C-Terminus, ein Serin, phosphoryliert wird. Die letzten fünf C-terminalen Aminosäuren von TASK1 (-RRSS<sup>P</sup>V) bzw. TASK3 (-RRKS<sup>P</sup>V) werden phosphorylierungsabhängig von 14-3-3-Proteinen gebunden, die den Transport der K2P-Kanäle an die Zelloberfläche ermöglichen (O'Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002). Als weiteres akzessorisches Protein von TASK1 wurde das Adaptorprotein p11 identifiziert, welches an eine Region im proximalen C-Terminus bindet (Renigunta et al, 2006). Dieses Protein stellt möglicherweise eine Art „Retentionsfaktor“ dar, denn TASK1-Kanäle und –Reporterproteine ohne p11-Bindedomäne werden verstärkt an die Zelloberfläche transportiert. p11-Proteine weisen ein konserviertes C-terminales Motiv auf, welches dem klassischen (K/H)xKxx-Rückführungssignal nicht unähnlich ist. Die Autoren schlagen vor, dass TASK1 zusätzlich über p11 und sein Zwei-Lysin-Motiv an COPI gebunden sein könnte (Renigunta et al, 2006). Im Zuge einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jürgen Daut in Marburg sollten nun mit Hilfe von TASK1- und TASK3-Reporterproteinen die Auswirkungen verschiedener Mutationen der N- und C-terminalen Bindemotive untersucht werden.

### 2.4.1 Einfluss von C-terminalen Deletionen und Trunkationen auf die Oberflächenexpression von CD8TASK1

Vergleicht man die C-terminalen Enden von TASK1- und TASK3-Proteinen verschiedener Spezies, fällt ein Motiv von drei basischen Aminosäuren auf, welches mit dem zuvor

charakterisierten, fünf Aminosäuren-umfassenden 14-3-3-Bindemotiv überlappt (Abbildung 28 (B)). Um zu untersuchen, ob diese basischen Aminosäuren möglicherweise eine Variante des Arginin-haltigen (RxR) ER-Lokalisationssignales (Zerangue und Schwappach et al, 1999) darstellen, wurden Reporter-Fusionskonstrukte kloniert, in denen der C-Terminus von TASK1 (CD8TASK1) und verschiedene Varianten davon an das dimere Oberflächenprotein CD8 fusioniert sind: Bei CD8TASK1 $\Delta$ C1 fehlt das letzte Valin, welches für die Bindung von 14-3-3-Proteinen essentiell ist, CD8TASK1 $\Delta$ C5 ist um das putative ER-Lokalisationssignal kürzer; bei CD8TASK1 $\Delta$ i20 fehlt die p11-Bindungsdomäne (Renigunta et al, 2006), CD8TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C1 und CD8TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C5 stellen Kombinationen dar. Diese Reporterfusionen wurden in Säugerexpressionsvektoren einkloniert (pcDNA3, Invitrogen) und transient in COS-1-Zellen transfiziert. 24h danach wurden die Zellen fixiert, mit anti-CD8-Antikörpern gefärbt und die Präsenz der Reporterproteine an der Zelloberfläche luminometrisch bestimmt (Abbildung 28 (C)). Als Positiv- (intrazelluläre Retention) und Negativ- (keine Retention) Kontrolle dienten zwei Reporterproteine aus CD8 und dem C-Terminus des Wbp1-Proteins mit dem ER-Lokalisationssignal -KKTN (CD8KKXX) bzw. mit mutiertem ER-Lokalisationssignal -AATN (CD8AAXX) (Yuan et al, 2003).

Die Kontrollproteine verhalten sich wie erwartet, CD8KKXX wird intrazellulär retentiert und CD8AAXX stark an die Plasmamembran gebracht. Der TASK1-C-Terminus voller Länge gelangt in dimerisierter Form an die Oberfläche, die Varianten  $\Delta$ C1 und  $\Delta$ C5 erzeugen dagegen ein um ca. 60% niedrigeres Oberflächensignal. Es ist kein Unterschied zwischen CD8TASK1 $\Delta$ C1 und CD8TASK1 $\Delta$ C5 auszumachen. Die Deletion der p11-Bindedomäne hat den gegenteiligen Effekt und übertrifft sogar noch die Negativkontrolle CD8AAXX an Oberflächenpräsenz. Da der „Retentionsfaktor“ p11 (Renigunta et al, 2006) nicht mehr binden kann, steht dem Oberflächentransport nichts mehr im Wege. Kombiniert man nun die Deletion der p11-Bindedomäne mit der Valintronkation, wird das dimere Reporterprotein noch stärker retentiert als das mit der Valintronkation. Entfernt man jedoch das gesamte putative ER-Lokalisationsmotiv und die p11-Bindedomäne, gelangt das CD8-Fusionsprotein so effizient an die Zelloberfläche wie das ohne die p11-Bindesequenz. Das Entfernen der p11-Domäne und somit das Ausschalten der „Konkurrenzretention“ ermöglicht den Fokus auf die Wirkung der Deletion des putativen ER-Lokalisationssignales. Während die Deletion des Valins einen Verlust der 14-3-3 Bindung verursacht und dazu führt, dass das Protein durch die Unversehrtheit des Arginin-haltigen Motivs stark intrazellulär zurückgehalten wird, ermöglicht das Entfernen des Arginin-haltigen Motivs den Vorwärtstransport.

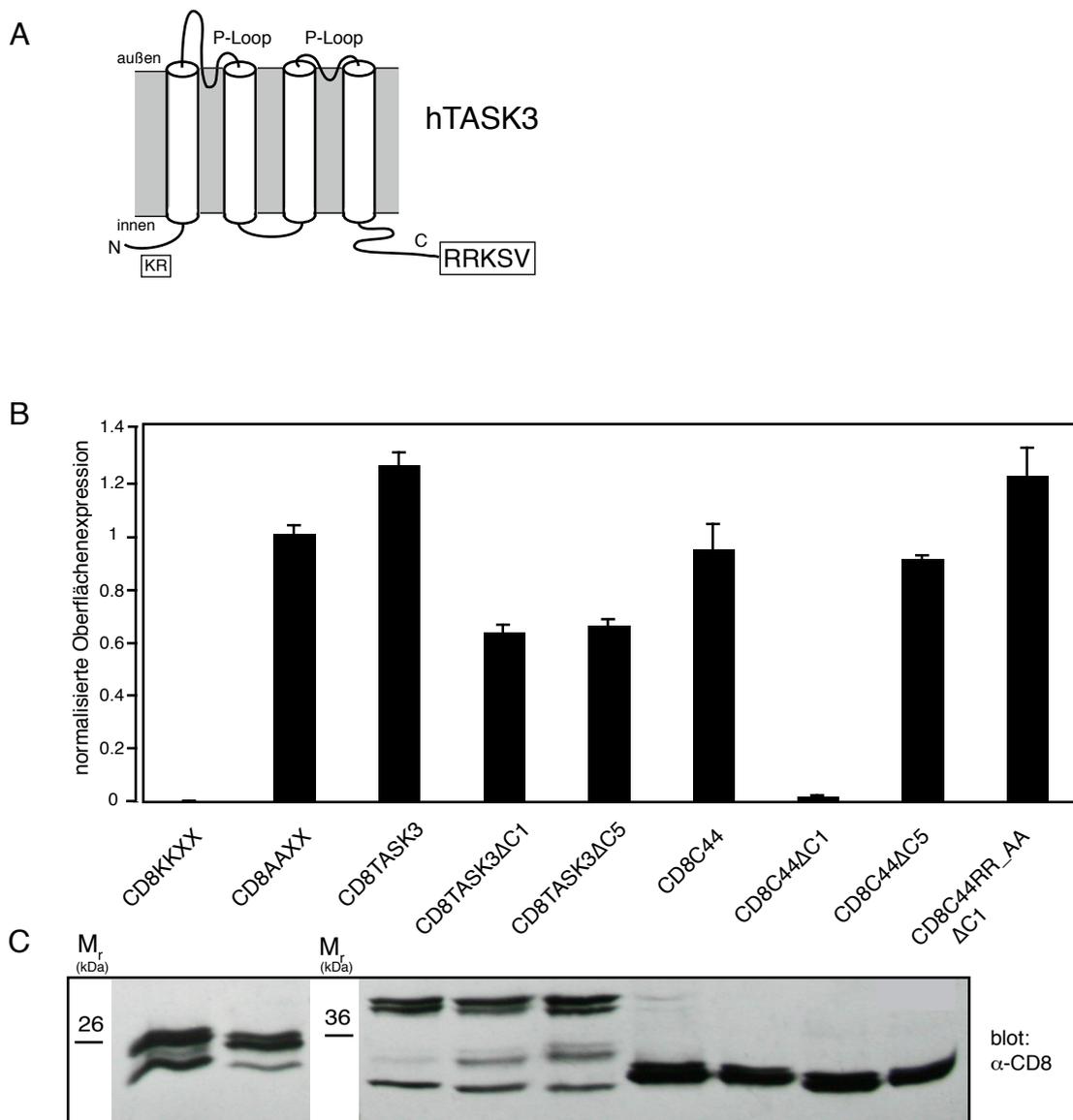


**Abbildung 28: Deletionen und Trunkationen des C-Terminus von TASK1 beeinflussen die Oberflächenexpression von CD8-TASK1-Reporterproteinen.** (A) Cartoon einer Untereinheit des  $K^+$ -Kanals TASK1. Wie alle K2P-Proteine setzt sich TASK1 aus zwei gleichen Untereinheiten zusammen, die jede vier Transmembransegmente und zwei Poren-formende Schleifen (P-loops) aufweisen (Plant et al, 2005). Die p11-Bindedomäne ist rot dargestellt (B) C-terminale Sequenzabschnitte von TASK1- und TASK3-Proteinen menschlicher und Ratten-Spezies. (C) Oberflächenexpression von COS-1-Zellen, transient transfiziert mit Reporterproteinen, Fusionen aus dem Glykoprotein CD8 und Deletions- und Trunkationsvarianten des TASK1 C-Terminus. Als Kontrollen dienten Fusionen aus CD8 und dem C-terminalen Schwanz des Hefeproteins Wbp1, einmal mit dem ER-Lokalisationssignal -KKTN (KKXX) und einmal mit der Mutation -AATN (AAXX) (Yuan et al, 2003). 24h nach der transienten Transfektion mit den Fusionsproteinen wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte wurden normalisiert auf die Werte von CD8-AAXX (n=9). (D) Western-Blot-Detektion von COS-1-Zellen, transient transfiziert wie in (C). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate (gleiche Proteinmengen enthaltend) über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Western-Blot-Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen CD8. (E) Immunfluoreszenz von COS-1-Zellen, transient transfiziert mit den CD8TASK1-Reporterproteinen. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit einem Antikörpern gegen CD8 und dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert (grün).

Zur Überprüfung des Gesamtproteinexpressionslevels wurden COS-1-Zellen wie in (B) transient transfiziert und 24h später lysiert. Lysate gleicher Proteinmengen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der anschließende Western-Blot mit einem Antikörper gegen CD8 detektiert (Abbildung 28 (D)). Um den Verbleib der Fusionsproteine, die nicht an der Zelloberfläche erscheinen, zu untersuchen, wurden COS-1-Zellen wie in (C) und (D) (ohne Kontrollkonstrukte) transfiziert, die Zellen nach 24h fixiert, permeabilisiert und mit anti-CD8 Antikörpern gefärbt (Abbildung 28 (E)). Während CD8TASK1,  $-\Delta i20$  und  $-\Delta i20\Delta C5$  die schon im Oberflächenassay gezeigte starke Oberflächenpräsenz zeigen, lokalisieren  $-\Delta C1$ ,  $-\Delta C5$  und  $-\Delta i20\Delta C1$  hauptsächlich intrazellulär in Vesikel-artigen Clustern. CD8TASK1 $\Delta C1$  und CD8TASK1 $\Delta C5$  zeigen außerdem Lokalisation an der Plasmamembran bzw. am ER/Golgi, wohingegen CD8TASK1 $\Delta i20\Delta C1$  überhaupt nicht an der Zelloberfläche auszumachen ist, sondern über das gesamte Zellsoma verteilte Punkte markiert.

#### **2.4.2 Einfluss von C-terminalen Mutationen und Trunkationen auf die Oberflächenexpression von CD8TASK3**

Für die Untersuchung der Interaktion von 14-3-3-Proteinen und TASK3 (Abbildung 29 (A)), wurde ebenfalls der gesamte C-Terminus an CD8 fusioniert (CD8TASK3), oder aber die schon von den TASK1-Experimenten bekannten Trunkationsvarianten  $-\Delta C1$  (CD8TASK3 $\Delta C1$ ) und  $-\Delta C5$  (CD8TASK3 $\Delta C5$ ). Außerdem wurden die letzten 44 C-terminalen Aminosäuren vollständig oder mit Deletion des Valinrestes (CD8C44 $\Delta C1$ ) bzw. trunkierter ER-Lokalisationsdomäne (CD8C44 $\Delta C5$ ) an CD8 fusioniert. Weiterhin wurde der C44-Schwanz mit der Valin-Deletion sowie einer Mutation kombiniert, in der die beiden Arginine durch Alanine ersetzt sind (CD8C44-RR\_AA $\Delta C1$ ). Die aufgeführten Fusionen wurden in Säugerexpressionsvektoren inkloniert (pcDNA3) und transient in COS-1-Zellen transfiziert. Nach 24h erfolgte die Fixierung, Färbung mit anti-CD8-Antikörper und schließlich die chemilumineszente Detektion der CD8-Fusionen (Abbildung 29 (B)). Wie erwartet, wird CD8TASK3 stark an die Zelloberfläche transportiert. Es ist bekannt, dass TASK3-Kanäle viel besser in *Xenopus* Oocyten und Säugerzellen exprimieren als TASK1-Kanäle (Renigunta et al, 2006). Diese Beobachtung wird auf die bei TASK3 fehlende p11-vermittelte Retention zurückgeführt. Entfernt man nun das Valin ( $-\Delta C1$ ) oder das putative Retentionsmotiv ( $-\Delta C5$ ), reduziert sich die Oberflächenexpression um etwa die Hälfte (gleicher Effekt bei TASK1). Beobachtet man den Einfluss der letzten 44 TASK3-Aminosäuren auf den Vorwärtstransport von CD8, erscheint dieser im Vergleich zum C-Terminus voller Länge etwas reduzierter. Bei Wegnahme der letzten Aminosäure im C44-Kontext, gelangt CD8 überhaupt



**Abbildung 29: Mutationen und Trunkationen des C-Terminus von TASK3 beeinflussen die Oberflächenexpression von CD8-TASK3-Reporterproteinen.** (A) Cartoon einer Untereinheit des Kalium-Kanals TASK3. Wie alle K2P-Proteine setzt sich TASK3 aus zwei gleichen Untereinheiten zusammen, die jede vier Transmembransegmente und zwei Poren-formende Schleifen (P-loops) aufweisen (Plant et al, 2005). (B) Oberflächenexpression von COS-1-Zellen, transient transfiziert mit Reporterproteinen, Fusionen aus dem Glykoprotein CD8 und C-terminalen Varianten von TASK3. Als Kontrollkonstrukte dienten Fusionen aus CD8 und dem C-terminalen Schwanz des Hefeproteins Wbp1, einmal mit dem ER-Lokalisationssignal -KKTN (KKXX) und einmal mit der Mutation -AATN (AAXX) (Yuan et al, 2003). 24h nach der transienten Transfektion mit den Fusionsproteinen wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Messwerte wurden normalisiert auf die Werte von CD8-AAXX (n=9). (C) Western-Blot-Detektion von COS-1-Zellen, transient transfiziert wie in (A). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate (gleiche Proteinmengen enthaltend) über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Western-Blot-Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen CD8.

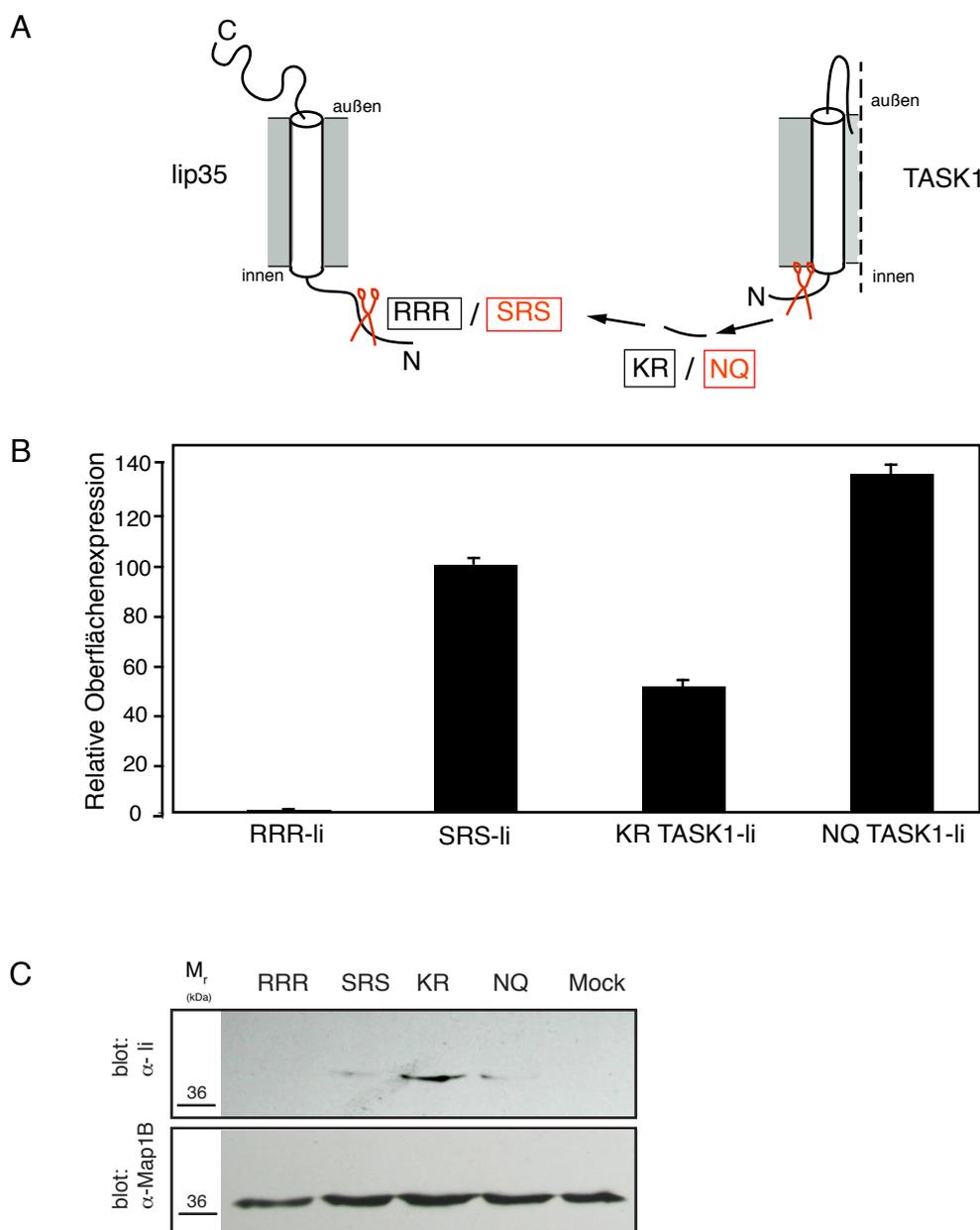
nicht mehr an die Zelloberfläche, bei Wegnahme der letzten fünf Aminosäuren hingegen kann CD8 so effizient vorwärts transportiert werden wie mit den kompletten 44 Aminosäuren von TASK3. Eine mit dem Volle-Länge-C-Terminus vergleichbare Oberflächenexpression zeigt die Kombination CD8C44-RR\_AAΔC1. Das Verhalten der TASK3-Reporter lässt sich mit der CD8TASK1-Reporterproteine vergleichen. Durch Verwendung der letzten 44 Aminosäuren lässt sich eine mit CD8TASK1Δi20 vergleichbare Situation herstellen; möglicherweise ist der Abstand des TASK3-C-Terminus zur Membrandomäne von CD8 entscheidend, damit die Unterschiede zwischen -ΔC1 und -ΔC5 in diesem Reporterkontext zum Tragen kommen. Wie auch bei TASK1 führt die Wegnahme der für die 14-3-3-Bindung wichtige letzte Aminosäure zur Retention, während die Trunkation um das putative ER-Lokalisationsmotiv einen Transport an die Oberfläche ermöglicht. Kombiniert man die Deletion des Valins mit einer Mutation der zwei Arginine, wird das Reporterprotein ebenfalls effizient vorwärts transportiert.

Zur Überprüfung der Gesamtproteinexpressionslevels wurden COS-1-Zellen wie in (B) transient transfiziert und 24h später lysiert. Lysate gleicher Proteinmengen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der anschließende Western-Blot mit einem Antikörper gegen CD8 detektiert (Abbildung 29 (C)).

Die mit TASK1- und TASK3- Reporterproteinen erhaltenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass das in beiden TASK-C-Termini existierende Arginin-haltige Motiv ein ER-Lokalisationsmotiv darstellt, welches mit der 14-3-3-Bindestelle überlappt.

### 2.4.3 Wirkung des N-terminalen KR-Motivs von TASK(1)-Proteinen auf lip35

Das Typ II Membranprotein invariante Kette lip35 ist eine Untereinheit des „Major Histokompatibility Complex“ (MHC) Klasse II, ein Komplex, gebildet von drei verschiedenen Proteinuntereinheiten, der von Zellen des Immunsystems exprimiert wird und fremde Antigene präsentiert, damit sie von T-Zellen erkannt werden. Nur wenn alle MHC II-Untereinheiten in korrekter Stöchiometrie assemblieren, wird der Komplex an die Zelloberfläche entlassen (Khalil et al, 2003). lip35 trägt auf seinem intrazellulären N-Terminus ein Arginin-haltiges ER-Lokalisationssignal (Schutze et al, 1994). Kuwana et al konnten zeigen, dass an diesen N-terminalen Bereich in Abhängigkeit von der Phosphorylierung eines einzelnen Serins – Aminosäure Nummer acht (von Proteinbeginn an gezählt) – 14-3-3 Proteine binden. O’Kelly et al sprechen hier von Retentions- und Freisetzungs- (Release) Stellen, die direkt aufeinander folgen. In ihren Händen konnte β-COP N-terminale li-Peptide (MHRRRSRSC) nur binden, wenn Serin Nummer 8 nicht phosphoryliert oder durch eine andere saure Aminosäure ersetzt worden



**Abbildung 30: Das N-terminale KR-Motiv von TASK1 ist ein funktionelles ER-Lokalisationssignal.** (A) Schematische Darstellung des Typ-II-Membranproteins Invariante Kette (li) 35, dessen intrazellulärer N-Terminus ein ER-Lokalisationssignal trägt (Schutze et al, 1994). Das ER-Lokalisationssignal am N-Terminus wurde mutiert oder ausgetauscht gegen einen Teil des Task1-N-Terminus (rechts), der ebenfalls ein ER-Lokalisationssignal (KR) enthält (O’Kelly et al, 2002). „NQ“ ist eine Mutation der KR-Sequenz von TASK1. Die Mutationen sind jeweils in roter Schrift dargestellt (B) Relative Oberflächenexpression (Verhältnis Oberflächenexpression zu Gesamtmenge des exprimierten Proteins) der Proteine in COS-1-Zellen. Die Zellen wurden transient transfiziert mit der Invarianten Kette bzw. ihren N-terminalen Mutanten, 24h nach der Transfektion fixiert, mit oder ohne Triton X-100 behandelt und mit einem Antikörper gegen lip35 (erkennt extrazelluläres Epitop) gefärbt. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper ermöglichte die Messung der relativen Oberflächenpräsenz in einem Luminometer. Die Werte wurden normalisiert auf „SRS-li“ (n=5). (C) Western-Blot-Detektion von COS-1-Zellen, transient transfiziert wie in (B). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate (gleiche Proteinmengen enthaltend) über 10% SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Western-Blot-Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen lip35 (oben) bzw. gegen Map1B, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein (unten, als Ladekontrolle). MOCK= Zellysate nicht transfizierter COS-1 Zellen

war. Im Gegensatz dazu konnten 14-3-3 Proteine nur die li-Peptide binden, die ein phosphoryliertes Serin trugen (MHRRRSRS<sup>P</sup>C).

Um zu untersuchen, wie ob das N-terminale KR-Motiv von TASK1 (bzw. TASK3; bei beiden TASK-Proteinen stimmen die ersten neun Aminosäuren, die das KR-Motiv enthalten, überein) in einem anderen Proteinkontext funktionell ist, wurde der N-Terminus von TASK1 an die invariante Kette lip35 transplantiert (Abbildung 30 (A)). Außer dem nativen lip35 (-RRR, als Positivkontrolle) sowie einer Mutationsvariante mit inaktivem ER-Lokalisationssignal (-SRS, als Negativkontrolle) wurde die „Chimäre“ N-TASK1(KR)-li35 und die Chimäre N-TASK1(NQ)-li35 mit inaktivem ER-Lokalisationssignal in Säugerexpressionsvektoren kloniert (pcDNA3) und transient in COS-1-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24h später mit oder ohne Triton X-100 behandelt und die Präsenz der Proteine an der Oberfläche nach Färbung mit einem Antikörper gegen lip35 (gegen ein extrazelluläres Epitop) luminometrisch bestimmt (Abbildung 30 (B)). Das Balkendiagramm stellt die relative li-Oberflächenexpression dar, also das Verhältnis von Oberflächenexpression zur Expression insgesamt. Dies war notwendig, um den unterschiedlichen Expressionsniveaus der Reporterproteine gerecht zu werden. Die invariante Kette li35 mit aktivem Arginin-haltigen Signal ist stark intrazellulär retentiert, kann jedoch durch Mutation von zwei Argininen zu Serin an die Oberfläche gelangen. Mit transplantiertem TASK1-N-Terminus ist die Oberflächenexpression von lip35 um etwa 50% reduziert (im Vergleich zur Negativkontrolle). Die Mutation der KR-Sequenz zu NQ im TASK1 N-Terminus verursacht eine um das zweieinhalb-fache erhöhte relative Oberflächenexpression. Diese Ergebnisse bestätigen O'Kelly et al in der Annahme, dass die KR-Sequenz in TASK1 und TASK3 ein funktionelles Retentions/Retrieval-Signal darstellt.

Abbildung 30 (C) zeigt die Western-Blot-Detektion der in (B) beschriebenen Proteine. COS-1-Zellen wurden transient transfiziert und 24h später lysiert. Lysate gleicher Proteinmengen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der anschließende Western-Blot zuerst mit einem Antikörper gegen lip35 und dann mit einem Antikörper gegen Map1B (ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein) detektiert. Der anti-li-Antikörper weist starke unterschiedliche Mengen der Proteine nach, erstaunlicherweise mehr von den chimären Formen als von den nativen. Dass im Oberflächenassay den Unterschieden im Expressionsniveau Rechnung getragen wurde, sieht man daran, dass das stärkste Signal im Western-Blot nicht dem stärksten im Oberflächenversuch entspricht.

## 3 Diskussion

### 3.1 Subzelluläre Kompartimentierung von $K_{ATP}$ -Untereinheiten

Im Jahre 1984 wurde der ATP-sensitive Kalium-Kanal als der für die Glukose-induzierte Depolarisation der pankreatischen  $\beta$ -Zelle verantwortliche Kaliumkanal identifiziert (Ashcroft et al, 1984; Cook et al, 1984). Das Schließen dieses Kanals und damit die Unterbrechung des bei niedrigem Blutzucker Spiegel konstanten  $K^+$ -Effluxes führt zur Depolarisation der Plasmamembran, die wiederum einen  $Ca^{++}$ -Influx durch Spannungs-abhängige  $Ca^{++}$ -Kanäle bewirkt. Der Anstieg an intrazellulären  $Ca^{++}$ -Ionen führt zur Freisetzung von Insulin in die Blutbahn. Die beschriebene Reaktion auf erhöhte Blutzuckerwerte wird auch erste oder akute,  $K_{ATP}$ -abhängige Phase der Insulinsekretion bezeichnet. Ihr folgt eine zweite oder anhaltende,  $K_{ATP}$ -unabhängige Phase, die gekennzeichnet ist durch eine verstärkte langanhaltende Sekretion von Insulin bis zu einem Plateau. Die mechanistische Grundlage für die zweite, die Amplifikations-Phase ist noch nicht komplett verstanden, Straub und Sharp favorisieren die Hypothese einer Glukose-induzierten Anaplerose, welche mitochondriale kataplerotische Signale (z.B. Pyruvat-Citrat-Shuttle) erzeugt, die die  $Ca^{++}$ -stimulierte Exozytose verstärken (Farfari, et al, 2000). Außer der  $K_{ATP}$ -unabhängigen,  $Ca^{++}$ -abhängigen 2. Phase existiert wohl eine  $K_{ATP}$ -unabhängige,  $Ca^{++}$ -unabhängige 2.Phase, welche GTP benötigt (Komatsu et al, 1998). Die  $K_{ATP}$ -abhängigen und  $K_{ATP}$ -unabhängigen Wege arbeiten synergistisch bei der Erzeugung einer biphasischen Antwort auf erhöhte Glukosewerte. Beide Phasen kennzeichnet die Bewegung von Insulin-enthaltenden sekretorischen Granula, die nach dem Erreichen der Plasmamembran und der Reifung ihren Inhalt exozytotisch freisetzen. Man unterscheidet hier generell zwischen Granula oder Vesikeln, die intrazellulär in einem „Reservepool“ gespeichert sind (ca. 90% der 9000-13000 Granula pro  $\beta$ -Zelle (Dean, 1973; Olofsson et al, 2002)) und solchen, die an die Plasmamembran angelagert sind. Von den Membran-nahen Vesikeln gibt es solche, die reif sind und bereit für die Exozytose und solche, die noch nicht bereit sind für die Freisetzung. Die sofort freisetzbaren Vesikel machen einen äußerst geringen Prozentsatz aus (< 1%) und kennzeichnen einen eigenen Bereich („readily-releasable pool“) innerhalb der angelagerten Vesikel (Proks et al, 1996). Sie sind es auch, die in der ersten Phase freigesetzt werden, während in der 2.Phase Vesikel zur Freisetzung vorbereitet werden (durch Translokation und Reifung) und der Auffüllung des zuvor beschriebenen Pools dienen. Dabei begrenzt in der zweiten Phase nicht die Translokation zur Plasmamembran, sondern die Reifung bzw. die Auffüllung des „Readily-Releasable-Pools“ die freisetzbare Insulin-Menge

(Bratanova-Tochkova et al, 2002). Auch wenn die Amplifikations-Phase als  $K_{ATP}$ -unabhängige Phase beschrieben wird, gibt es doch Hinweise, dass die  $K_{ATP}$ -Untereinheiten weitere Aufgaben außerhalb der Depolarisation der Plasmamembran in der ersten Phase der Insulinsekretion haben könnten. So interagiert z.B. SUR1 spezifisch mit cAMP-GEFII, welches cAMP-abhängige, Protein-Kinase-A-unabhängige Insulinsekretion vermitteln kann (Shibasaki et al, 2004). Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass Adenin-Nukleotide an der Kopplung von Glukose-Metabolismus und Insulin-Sekretionsrate beteiligt sind (Sato et al, 1998). Die Tatsache, dass ATP für die Exozytose essentiell ist, bei der Reifung der Granula benötigt wird und dass die als ATP-Sensoren funktionierenden  $K_{ATP}$ -Kanäle sogar vornehmlich in diesen Granula und nicht an der Plasmamembran präsent sind (Geng et al, 2003; Varadi et al, 2006), untermauern die Überlegungen hinsichtlich weiterer Aufgaben von  $K_{ATP}$  außerhalb der in der ersten Phase der Insulinsekretion. Mögliche Hinweise sollte die Untersuchung der Lokalisation des  $K_{ATP}$ -Kanals in Abhängigkeit von der Anwesenheit der einzelnen Untereinheiten geben.

Zur Untermauerung der von Geng und Varadi gemachten Beobachtung der Kolo-kalisation von  $K_{ATP}$ -Kanälen und sekretorischen Granula, wurde in dieser Arbeit ein Homogenat von der INS-1- $\beta$ -Zelllinie in einem Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert. Tatsächlich kofraktionierten SUR1 und Kir6.2 mit Carboxypeptidase E (CPE), einem Markerprotein für Insulin-haltige sekretorische Vesikel (Abbildung 7).

### 3.1.1 RNAi reduziert Expression von $K_{ATP}$ -Untereinheiten in COS-1-Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses der einzelnen  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten auf die Lokalisation pankreatischer  $K_{ATP}$ -Kanäle, wurden jeweils drei verschiedene RNAi-Sequenzen zur spezifischen Herabregulierung von Kir6.2 bzw. SUR1 mit Hilfe eines siRNA-Designprogrammes und unter bestimmten Kriterien ausgewählt. Eine daraus abgeleitete shRNA-Sequenzabfolge von „Sense-Strang“ und „Antisense-Strang“ wurde synthetisch hergestellt und in einen Säugerexpressionsvektor inkloniert. Die Western-Blot-Analyse von COS-1-Zellen, transient transfiziert mit DNA für Kir6.2 bzw. SUR1 und jeweils einer shRNA, konnten die erfolgreiche spezifische Herabregulierung beider Kanaluntereinheiten durch jeweils eine der getesteten shRNAs zeigen (Abbildung 9).

### 3.1.2 Wirkungsweise von konstitutiv exprimierter RNAi in $\beta$ -Zelllinien

Für die Untersuchung der in COS-1-Zellen beobachteten RNAi-Effekte in einer  $\beta$ -Zelllinie wurden über lentivirale Expressionsvektoren das Reporterprotein GFP und die ausgewählte shRNA-Sequenz in Verpackungszellen eingebracht und mit solchermaßen produzierten Virionen die  $\beta$ -Zelllinie INS-1 transduziert. Die virale Transduktion wurde in diesem Fall der transienten Transfektion vorgezogen, da INS-1-Zellen erfahrungsgemäß schlecht transfizierbar sind. Ferner ermöglicht die Verwendung von Viren eine stabile Integration der exogenen DNA ins Genom der Zielzellen und damit eine konstitutive Expression. Mit einem FACS wurden solche transduzierten INS-1-Zellen sortiert, die GFP-fluoreszent waren, d.h. das lentivirale Konstrukt mit Reporter- und shRNA-Sequenz ins Genom integriert hatten (Abbildung 10 + 12). Einmal sortierte Zellen wurden sowohl weiteren Sortierungs- bzw. Anreicherungsrounds als auch Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen unterzogen. Über eine Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass konstitutiv shRNA-6.2-1684 exprimierende INS-1-Zellen deutlich weniger Kir6.2-Protein exprimierten als Kontrollzellen (Abbildung 11). Um den Einfluss der reduzierten Kir6.2-Expression auf die Lokalisation von Kir6.2 und SUR1 zu untersuchen, wurden fixierte Zellen der Linie INS-1-6.2-1684 und INS-1-U6 permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen Kir6.2 bzw. SUR1 gefärbt (Abbildung 11). Die Fluoreszenz im GFP-Kanal bestätigte die konstitutive Expression des GFP-Reporters. Kir6.2 lokalisiert in beiden Zelllinien intrazellulär in einem diffus-punktartigen Verteilungsmuster, welches den Nukleus ausspart. SUR1 erscheint ebenfalls in Punkten, allerdings in größeren, z.T. zu Clustern zusammengefassten. Die Anzahl der Cluster scheint in INS-1-6.2-1684 reduziert, die SUR1-Punkte eher verteilt im Vergleich zu den Kontrollzellen. Ein nahezu identisches Lokalisationsmuster zeigen INS-1-SUR1-2918-Zellen (Abbildung 12). Kir6.2 ist in feinen Punkten über das gesamte Zellsoma verteilt, SUR1 in größeren, z.T. zu Clustern zusammengefassten Punkten. Die Cluster erscheinen zahlenmäßig verringert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Eine gravierende Veränderung in der Lokalisation von Kir6.2 und SUR1 konnte weder für INS-1-6.2-1684 noch für INS-1-SUR1-2918 epifluoreszenzmikroskopisch festgestellt werden. Western-Blot-Analysen von INS-1-SUR1-2918-Zellen lieferten unbefriedigende und z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Weder die Qualität der getesteten Antikörper noch die der Western-Blot-Transfers von über SDS-PAGE aufgetrenntem SUR1-Protein waren gut genug, um eindeutige Aussagen über Unterschiede im SUR1-Expressionsniveau treffen zu können. Das Problem, natives, partiell- oder komplexglykosyliertes SUR1-Protein als diskrete Bande auf einem Western-Blot ausmachen zu können,

ist im  $K_{ATP}$ -Feld hinlänglich bekannt. Das Fehlen guter Antikörper veranlasst zur Verwendung von Myc-, Flag- oder HA- markiertem SUR1, welches zur Untersuchung transient in COS- oder HEK-Zellen transfiziert wird (z.B. Taschenberger et al, 2002; Crane und Aguilar-Bryan, 2004; Hu et al, 2003; Mikhailov und Campbell, 2005; Zerangue und Schwappach, 1999). Eine halbwegs befriedigende Detektion von nativem SUR1-Protein ermöglicht die Aufkonzentrierung durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Varadi et al, 2006; diese Arbeit Abbildung 7).

### 3.1.2.1 Langzeiteffekte in den RNAi- $\beta$ -Zelllinien

Da die epifluoreszenzmikroskopische Untersuchung der transduzierten INS-1-Zelllinien trotz z.T. durch Western-Blot-Analysen bestätigte effiziente Herabregulierung der  $K_{ATP}$ -Kanaluntereinheiten keine eindeutigen Unterschiede im Lokalisationsmuster im Vergleich zu den Kontrollzellen ergeben hatte, sollte eine subzelluläre Fraktionierung Aufschluss über eine möglicherweise geringe bzw. durch mikroskopische Analyse nicht auszumachende Veränderung der Lokalisation geben. Da INS-1-Zellen sehr langsam proliferieren (Asfari et al, 1992), für die Western-Blot-Detektion von nativem Kir6.2- bzw. SUR1-Protein nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation aber viele Zellen (mind.  $1 \times 10^8$ ) benötigt werden, mussten die Zelllinien über mehrere Wochen bis Monate hinweg passagiert und kultiviert werden. Nach dieser Zeit wiesen sie jedoch keinerlei GFP-Fluoreszenz mehr auf, außerdem konnte in Western-Blot-Analysen von INS-1-6.2-1684-Zellen keine Reduktion der Kir6.2-Expression mehr ausgemacht werden. Das Fehlen der (GFP-) Kontrolle der stabilen Integration des lentiviralen Konstruktes sowie das Fehlen der anfangs beobachteten RNAi-Effekte, machen die Untersuchung der Lokalisation von  $K_{ATP}$ -Kanälen in Abhängigkeit von den einzelnen Untereinheiten unmöglich. Da die anfangs hohe GFP-Fluoreszenz der sortierten INS-1-Zellen möglicherweise aus einer Mehrfach-Integration der viralen Transkripte resultierte, was sich evtl. negativ auf die Wirkung der shRNA auswirkte, wurden Einzelklone von zuvor nicht-sortierten INS-1-6.2-1684- bzw. INS-1-SUR1-2918-Zellen aus den GFP-Intensitätsbereichen niedrig, mittel und hoch abgelegt, hochgezogen und in Western-Blot-Analysen miteinander verglichen (Abbildung 13). Deutliche RNAi-Effekte auf die Expression von endogenem Kir6.2-Protein konnten für die Population des Einzelklons INS-1-6.2-1684-H2 ausgemacht werden. In einer Immunfluoreszenzfärbung lokalisierten beide  $K_{ATP}$ -Untereinheiten ebenso in intrazellulären Punkten wie Insulin, welches Insulin-enthaltende Vesikel markiert, und nicht an der Plasmamembran. Diese Beobachtung bestätigt die von Geng et al in pankreatischen Maus- $\beta$ -Inselzellen. Intensive Anfärbung von Insulin-sezernierenden Vesikeln ging mit einer geringen bis gar nicht mehr detektierbaren Färbung der Plasmamembran einher. Die relative Dichte

pankreatischer  $K_{ATP}$ -Kanäle in Vesikelmembranen ist im Vergleich zu der in der Plasmamembran extrem hoch. So berichten auch elektrophysiologische Schätzungen von nicht mehr als ein paar Hundert  $K_{ATP}$ -Kanälen in der Plasmamembran (Cook et al, 1988).

Die Auswertung zeigte keine veränderte Lokalisation von Kir6.2 und SUR1 im Vergleich zu den Kontrollzellen und belegte außerdem einen erneuten Verlust der GFP-Fluoreszenz und damit der Integrationskontrolle. Die von Einzelklonen abstammenden Populationen der INS-1-SUR1-2918-Zelllinie hatten ebenfalls die GFP-Fluoreszenz verloren. Die siRNA-Effekte bzw. Integrationseffizienz sind ausschließlich auf Proteinebene getestet worden, anhand von Antikörper-Detektionen (für Kir6.2) bzw. anhand eines Reporterproteins (GFP). Quantitative Validierungsmethoden wie Northern-Blot oder quantitative RT-PCR sind generell möglich, der Detektion auf Ebene des endogenen Proteins jedoch nicht vorzuziehen, da z.B. die RT-PCR mit falsch gesetzten Primern zu Fehlinterpretationen führen kann (Shepard et al, 2005; Sandy et al, 2005). Für die Detektion der mRNA-Level von SUR1 wäre eine quantitative RT-PCR dennoch die bessere Methode, da bis heute gute Antikörper gegen SUR1 fehlen. Die Tatsache, dass die transduzierten INS-1-Zellen nach gewisser Zeit keine RNAi-Effekte und keine Reporter-Fluoreszenz mehr zeigen, mag an der „Stilllegung“ (Silencing) der viralen DNA liegen. Möglicherweise binden Trans-agierende Faktoren an die viralen Promotoren in den langen terminalen Wiederholungen (LTR) oder das retrovirale Genom und die flankierenden Sequenzen werden durch Methylierung inaktiviert. So haben Cherry et al beobachtet, dass Passagen von infizierten embryonalen Stammzellen über einen längeren Zeitraum hinweg zu einer Methylierungs-abhängigen Stilllegung der Virus-DNA führte, nicht jedoch kurzzeitige Expression der viralen DNA. Auch wenn Pfeifer et al zeigen konnten, dass Gene über lentivirale Vektoren effizient in embryonale Stammzellen (ES) der Maus eingebracht werden können und die Expression des Transgens während der Proliferierung der undifferenzierten ES stabil bleibt, berichten andere von positionellen Stilllegungseffekten wie z.B. Rubinson et al (2003), die in einigen Zellen zwar die Expression eines GFP-Reporters aber nicht die der shRNA-Expression sehen konnten. Ferner berichten sie von Gewebe-abhängigen siRNA-Effekten. Nicht zu vergessen sind auch die Zeiträume, innerhalb derer die RNAi-Effekte untersucht worden sind, so waren die ältesten untersuchten Mäuse neun Wochen alt. Die transduzierten INS-1-Zellen wurden z.T. über einen weitaus längeren Zeitraum hinweg kultiviert.

Eine Möglichkeit, einer durch längere konstitutive Expression von Transgenen hervorgerufenen Stilllegung vorzubeugen, wäre die Verwendung Tet-induzierbaren lentivirale Vektoren (Wiznerowicz und Trono, 2003). Ferner könnte die Verwendung von Resistenz-vermittelnden Gensequenzen auf den lentiviralen Vektoren die Generierung einer homogenen Zell-Population

erleichtern. Weiterhin könnten  $\beta$ -Zell-spezifische Promotoren für die Expression der shRNA verwendet werden, so dass auch bei niedriger Integrationsrate (und damit geringerer Gefahr von Positionseffekten) eine hohe Expression gewährleistet ist.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit wirksame siRNAs gegen sowohl die Expression von Kir6.2 als auch SUR1 identifiziert werden. Es ist allerdings nicht gelungen, diese an einer biochemisch verwertbaren Menge von INS-1 Zellen anzuwenden.

## 3.2 14-3-3-Proteine und $K_{ATP}$ -Untereinheiten

### 3.2.1 Reduktion endogener 14-3-3-Proteine stört den Vorwärtstransport von $K_{ATP}$ -Kanälen

Die beiden  $K_{ATP}$ -Untereinheiten Kir6.2 und SUR1 enthalten Arginin-Motive (RKR) in ihren zytosolischen Domänen, die verhindern, dass einzelne Untereinheiten oder falsch assemblierte  $K_{ATP}$ -Komplexe an die Plasmamembran transportiert werden (Zerangue und Schwappach et al, 1999). Damit ist die Koexistenz beider  $K_{ATP}$ -Untereinheiten essentiell für die Funktionalität als Kaliumkanal. Möglicherweise spielt dabei die Maskierung der ER-Lokalisationssignale durch die jeweils andere Partneruntereinheit als auch durch zytosolische 14-3-3-Proteine eine Rolle, denn Experimente mit Kir6.2-Reporterproteinen haben nicht nur gezeigt, dass 14-3-3-Proteine an multimeren Kir6.2-C-Termini mit RKR-Motiv binden können, sondern auch, dass die Bindung einen Transport an die Plasmamembran ermöglicht (Yuan et al, 2003). Kir6.2-Untereinheiten können zwar in Abwesenheit von SUR1 Tetramere ausbilden, diese verbleiben jedoch im Zellinneren. Welche Rolle spielen nun die 14-3-3-Proteine in Bezug auf den  $K_{ATP}$ -Komplex, auf die Inaktivierung der RKR-Signale und den Transport zur Zelloberfläche? Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde in einem ersten Ansatz die Menge an „freiem“ 14-3-3-Protein reduziert um den Einfluss auf das Verhalten von  $K_{ATP}$ -Kanälen zu studieren. Mit Hilfe des 14-3-3-Scavengerproteins pGpLI-R18, welches mit hoher Affinität 14-3-3-Proteine an sich binden kann, konnte gezeigt werden, dass in Oocyten koexprimierte  $K_{ATP}$ -Untereinheiten um mehr als die Hälfte weniger  $K_{ATP}$ -Kanäle an der Oberfläche ausbilden können, wenn die Menge an endogenem *Xenopus*-14-3-3 durch Scavengerbindung verringert ist (Abbildung 14). Diese Daten legen nahe, dass 14-3-3-Proteine nicht nur am Vorwärtstransport von multimeren Kir6.2-Reporterproteinen, sondern tatsächlich auch an dem des  $K_{ATP}$ -Kanal-Komplexes beteiligt sind.

### 3.2.2 Zusätzliche 14-3-3-Rekrutierung verstärkt den Vorwärtstransport von Kir6.2-Reporterproteinen

Die Effekte des multimeren Scavengers pGpLI-R18 wurden auch in Säugerzellen untersucht, allerdings mit der Absicht, möglichst viel 14-3-3-Protein über den Scavenger (durch Interaktion der in beiden Proteinen vorhandenen Coiled-Coil-Domänen) an einen tetrameren Kir6.2-Reporter (CD4pLI-RKR) zu rekrutieren. Koexprimiert man Scavenger- und Kir6.2-Reporterprotein in COS-1 Zellen und misst die Oberflächenexposition von CD4, erscheint der Kir6.2-Reporter fast doppelt so stark an der Plasmamembran wie ohne zusätzliche 14-3-3-Rekrutierung durch den Scavenger (Abbildung 15). Das Gegenteil ist der Fall bei einer Koexpression mit einem Scavenger, der eine Mutation in R18 (Sequenz siehe Abbildung 14) aufweist und dadurch wenig oder gar kein 14-3-3-Protein mehr binden kann. Der Kir6.2-Reporter erscheint hier um die Hälfte weniger an die Zelloberfläche transportiert zu werden. Diese Ergebnisse belegen, dass zusätzlich über R18 rekrutiertes 14-3-3-Protein den Vorwärtstransport von multimeren Kir6.2-Reportern verstärken, d.h. dem ER-Lokalisationssignal entgegenwirken kann. Binden endogene 14-3-3-Proteine an „chimäre“ Tetramere mit niederaffinen und hochaffinen (R18) 14-3-3-Bindestellen, wird noch mehr Kir6.2-Reporterprotein vorwärts transportiert, binden sie an Chimäre aus niederaffinen (Kir6.2) und mutierten (R18m) 14-3-3-Bindestellen, ist der Vorwärtstransport weniger effektiv. Diese Ergebnisse bestätigen sowohl die Spezifität der Interaktion von 14-3-3-Proteinen und Kir6.2-C-Temini als auch die Rolle der 14-3-3s beim Vorwärtstransport dieses Kir6.2-Reporters. Dass es überhaupt möglich ist, durch zusätzliche 14-3-3-Rekrutierung den Vorwärtstransport zu verstärken, könnte daraufhin deuten, dass nicht alle RKR-Signale effizient maskiert sind und z.B. im Kontext nativen Kir6.2-Proteins die Rekrutierung der eigentlichen Partneruntereinheit SUR1 diese Aufgabe übernehmen könnte oder aber, dass eine durch das RKR-Motiv in SUR1 zusätzliche Rekrutierung von 14-3-3-Proteinen (und möglicherweise der Interaktion dieser mit der COPII-Vorwärtsmaschinerie) zu einer verstärktem Oberflächentransport führen könnte.

Mit den oben aufgeführten Ergebnissen vergleichbare Resultate erzielte die genomische Integration von über pLI tetramersiertem R18- bzw. EGFP-pLIR18-Protein in CHO-Zellen, in denen die Expression der viralen DNA durch Doxycyclin regulierbar ist. Eine mit der Induktion der R18-Expression zeitgleiche transiente Transfektion mit dem zuvor beschriebenen Kir6.2-Reporter veränderte die Oberflächenexposition des Reporters kaum, ein Anschalten der Expression des 14-3-3-Scavengers vor der Transfektion bewirkte jedoch eine deutlich verstärkte Oberflächenpräsenz. Die beiden Zelllinien zeigten ein vergleichbares Verhalten, für

die Ausbildung von „Chimären“ scheint es also irrelevant, ob tetrameres R18 an Protein G oder EGFP fusioniert ist.

### 3.2.3 Säuger-14-3-3-Proteine komplementieren den Vorwärtstransportdefekt in Hefezellen ohne 14-3-3-Proteine

Den sieben 14-3-3-Isoformen in Säugern stehen nur zwei in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber, BMH1 und BMH2. Die spezifische Herunterregulierung oder das Ausschalten aller für 14-3-3-Proteine kodierenden Gene ist bei der Anzahl in Säugern nahezu unmöglich und wäre mit Sicherheit lethal, die gute Manipulationsmöglichkeit des Hefegenoms und die hier übersichtliche 14-3-3-Anzahl jedoch ermöglichten es Roberts et al, einen Hefestamm zu generieren, der eine Doppeldeletion ( $\Delta bmh1\Delta bmh2$ ) aufweist und unter bestimmten Konditionen nicht lethal ist. So kann auf der Basis von 14-3-3-losen Zellen der Vorwärtstransport von Membranreporterproteinen untersucht werden. Diesen Vorteil haben sich Michelsen et al zunutze gemacht und die Lokalisation eines mit CD4pLI-RKR vergleichbaren Hefereporters in Zellen untersucht, die entweder kein BMH1 oder kein BMH2 mehr exprimierten oder gar kein 14-3-3-Protein mehr (2006). Der tetramere, den C-Terminus von Kir6.2 tragende Hefereporter Pmp2pLIYFP-RKR konnte nur in Anwesenheit von BMH1 das ER effizient verlassen, womit gezeigt worden ist, dass 14-3-3-Proteine auch in Hefe RKR-Signale erkennen und am Vorwärtstransport von diese Signale enthaltende Membranreportern beteiligt sind. Ferner konnte spezifisch eine Isoform als für diese Funktion verantwortlich gezeichnet werden (Michelsen et al, 2006). Um Aufschluss zu erhalten über die Spezifität von Säuger-14-3-3-Isotypen bzw. über eine mögliche Komplementation der Hefe-Isoform BMH1 durch eine der Säugerisoformen wurde jeweils eine Isoform stabil in die Doppel-Deletions-Hefen integriert und jeder Stamm mit Pmp2pLIYFP-RKR transformiert. Über YFP konnte die Lokalisation des Hefe-Kir6.2-Reporters in den Zellen verfolgt werden, die keine eigenen Hefe-14-3-3-Proteine mehr exprimierten, aber jeweils eine der sieben Säuger-Isoformen mit Hilfe des BMH1-Promotors (Abbildung 16). Die Isoform Sigma ließ sich unter keinen Umständen in Hefen integrieren, die entweder kein BMH1-Protein oder gar kein 14-3-3-Protein mehr hatten. Exogen eingeführtes 14-3-3-Sigma in sich-teilende Zellen kann zu einem Zell-Zyklus-Arrest in der M2-Phase führen, den gleichen Effekt verursachen Sigma-homologe Proteine in der Spalt-Hefe. Die Induktion von 14-3-3-Sigma ist normalerweise über p53 reguliert und kontrolliert den Übergang von der G2 zur M-Phase (Hermeking et al, 1997). Möglicherweise verursacht in  $\Delta bmh1\Delta bmh2$  eingebrachtes Sigma ebenfalls einen Zellzyklus-Arrest und kann somit nicht integriert werden.

Sowohl die Isoform Gamma als auch Zeta konnten den Verlust von BMH1 kompensieren und ermöglichten dem multimeren Hefe-Reporter das Verlassen des ER, belegt durch die Färbung der Vakuole. In den anderen mit 14-3-3-Isotypen versehenen Hefestämmen wie auch in der Doppel-Deletions-Hefe ohne jegliches 14-3-3-Protein lokalisierte der Reporter hauptsächlich in perinukleärem und subkortikalem ER. Die Säugerisoformen 14-3-3-Gamma und -Zeta scheinen in Hefezellen spezifisch mit multimeren Kir6.2-Reporterproteinen zu interagieren und am Vorwärtstransport beteiligt zu sein. Diese Ergebnisse sind insofern erstaunlich, als die Säugerisoform 14-3-3-Epsilon am ehesten zu BMH1 (und BMH2) homolog ist und Zeta und Gamma auch nicht gerade ein hochgradig homologes Paar darstellen (Abbildung 16 (A)). Es kann daraufhin deuten, dass diese Isoformen mehrere Aufgaben erfüllen, je nachdem, ob sie als Homo-Dimere oder Hetero-Dimere vorliegen. Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass Zeta-Homodimere die RKR-Signale ebenso gut erkennen wie Heterodimere aus Zeta und Epsilon, Homodimere aus Epsilon aber nicht. Die Ausbildung von Zeta/Epsilon-Heterodimeren *in vivo* ist z.B. von Jones et al. demonstriert worden (1995), weiterhin sind Zeta und Epsilon die beiden Isoformen, die spezifisch in einem Bindungs-Versuch mit einem tetrameren Kir6.2-Affinitätskonstrukt und zytosolischem Zellextrakt aus HeLa-Zellen angereichert worden sind (Yuan et al, 2003). Die Isoform Zeta interagiert außerdem mit dem Arginin-haltigen ER-Lokalisationsmotiv der GB1-Untereinheit des  $\gamma$ -Aminobuttersäurerezeptors GABA<sub>B</sub> und ermöglicht auch dem Zwei-Poren-Kaliumkanal TASK1 eine verstärkte Oberflächenexpression in *Xenopus* Oocyten (Brock et al, 2005; Rajan et al, 2002). Die Beschränkung der Untersuchung des Einflusses von ausschließlich homodimeren 14-3-3-Isoformen auf den Vorwärtstransport darf nicht darüber hinweg täuschen, dass weitere Isoformen involviert sein können, die aber, wie für Epsilon beschrieben, durch die Versuchsanordnung nicht detektiert werden können. Trotzdem ermöglicht die Entdeckung des positiven Einflusses der Isoformen Gamma und Zeta auf den Vorwärtstransport von tetrameren Kir6.2-Reportern in jedem Fall eine preliminäre Einschränkung der infrage kommenden Isoformen, die durch weitere Experimente wie z.B. die spezifische Herabregulierung der Isoformen durch RNAi bzw. genaue Analyse der Gewebe-spezifischen Expression verifiziert werden könnte. Theoretisch ist es denkbar, dass verschiedene 14-3-3-Isoformen den intrazellulären Transport pankreatischer K<sub>ATP</sub>-Kanäle regulieren, die offensichtlich hauptsächlich in Insulin-haltigen sekretorischen Vesikeln (siehe 3.1) und nur in geringer Kopienzahl an der Plasmamembran präsent sind.

### 3.2.4 Aminosäuren im distalen Kir6.2-C-Terminus beeinflussen den Vorwärtstransport von multimeren Reporterproteinen

Der Verlust des Transportes einer Trunkations-Variante des zuvor beschriebenen multimeren Kir6.2-Hefereporterproteins in die Vakuole trotz Anwesenheit beider Hefe-14-3-3-Proteine legte nahe, dass Aminosäuren außerhalb des Arginin-Motivs für die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen von Bedeutung sein könnten. Zur Überprüfung der Sachverhalte in Säugerzellen wurde der C-Terminus von Kir6.2 und dessen verschieden stark ausgeprägte Trunkationen sowohl an das Dimere ausbildende Oberflächenprotein CD8 als auch an künstlich tetramerisiertes CD4-Protein (pLICD4) fusioniert. Das Oberflächenverhalten dieser Proteine wurde in COS-1 Zellen quantitativ bestimmt und jeweils auf den Wert des schon bei Yuan et al charakterisierten Kontrollproteins mit inaktivem Arginin-Signal (-AAA) normalisiert (Abbildung 17). Während das Entfernen von drei bis zehn Aminosäuren zu einer geringeren Oberflächenexpression der CD8-Fusionsproteine im Vergleich zum Volle-Länge-C-Terminus (-RKR) führte, verstärkte die Wegnahme weiterer Aminosäuren den Transport zur Zelloberfläche. Im tetrameren Status bewirkt die Wegnahme von drei bis 12 Aminosäuren eine geringere Oberflächenexpression, die Wegnahme weiterer Aminosäuren einen graduellen Anstieg an Oberflächenexposition. Diese Resultate belegen die Bedeutung der stromabwärts des ER-Lokalisationssignals gelegenen Aminosäuren für den Transport an die Zelloberfläche. Unterschiede zwischen den CD8- und CD4pLI-Fusionen können den Einfluss der in Kir6.2 befindlichen Sortierungssignale in Abhängigkeit vom Multimerisierungsstatus und/oder Unterschiede im Oberflächenverhalten bzw. im Recycling der Glykoproteine CD8 und CD4 selbst widerspiegeln. Um den möglichen Einflussfaktoren Rechnung zu tragen, wurden Trunkationsvarianten mit gegensätzlichem Oberflächenverhalten ( $-\Delta C10$  und  $-\Delta C16$ ) zusätzlich an monomeres CD4 fusioniert. Abbildung 18 fasst die quantitative Oberflächenmessung der Fusionen an CD4, CD8 und CD4pLI zusammen. Da monomere CD4- und tetramere CD4pLI-Reporter am ehesten den möglichen nativen Zuständen von Kir6.2 entsprechen – als monomere Untereinheit mit exponiertem RKR-Signal verbleibt es im ER, als tetramere Kanaluntereinheit kann es mit SUR1 assembliert an die Zelloberfläche gelangen – und Endozytose-bedingte Unterschiede durch den gleichen Membranproteinanteil CD4 auszuschließen sind (Aiken et al, 1994), werden im Folgenden deren Oberflächenverhalten miteinander verglichen. Während monomeres CD4-RKR im ER verbleibt (Zerangue und Schwappach, 1999; Yuan et al, 2003), kann tetrameres CD4pLI-RKR ebenso vorwärts transportiert werden wie das korrespondierende Kir6.2-Hefereporterprotein (Michelsen et al, 2006). Die Multimerisierung ermöglicht die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen,

wodurch die Interaktion mit COPI unterbunden wird und der Kir6.2-Reporter zur Plasmamembran gelangen kann (Yuan et al, 2003). Die Mutation des ER-Lokalisationssignals zu  $-AAA$  bewirkt einen effizienten Oberflächentransport unabhängig vom Multimerisierungsstatus. Das spricht dafür, dass die Qualitätskontrolle durch COPI umgangen werden kann, da kein ER-Lokalisationssignal mehr vorhanden ist, welches eine Rückführung monomerer Reporter durch COPI verursachen könnte. Die Proteine können auf direktem Weg der Vorwärtstransport-Route folgen. In ähnlicher Weise verhält sich  $-RKR\Delta C16$ , wobei hier zumindest im monomeren Zustand noch ein gewisser Rückhalte-Effekt zu verzeichnen ist, jedoch schon stark abgeschwächt im Vergleich zu  $-RKR$ . Als Tetramer jedenfalls hält  $-RKR\Delta C16$  nichts mehr davon ab so stark an die Oberfläche zu gelangen wie  $-AAA$ . Ein komplett anderes Bild zeigt  $-RKR\Delta C10$ , welches sowohl als Monomer als auch als Tetramer stark intrazellulär retentiert wird. Möglicherweise greift hier ein zu  $-RKR\Delta C16$  gegensätzlicher Mechanismus der beeinträchtigten Erkennung durch 14-3-3-Proteine bei ungestörter Erkennung und Bindung an COPI oder einer „echten“ Retention im ER.

#### **3.2.4.1 Trunkationen im Kir6.2-C-Terminus beeinträchtigen die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen**

Um die Interpretationen der Korrelation zwischen der beschriebenen Oberflächenexposition und der Bindung an 14-3-3-Proteine experimentell zu bestätigen, wurden über anti-CD4-Antikörper und Protein A/G-Sepharose Koimmunpräzitationsexperimente mit den zuvor beschriebenen CD4pLI-Konstrukten in HEK-Zellen durchgeführt. Western-Blot-Analysen der Immunpräzitate bestätigten die Annahme der deutlich beeinträchtigten 14-3-3-Bindefähigkeit der beiden trunkierten Kir6.2-Varianten sowie der  $-AAA$ -Mutante im Vergleich zum Volle-Länge-C-Terminus von Kir6.2 (Abbildung 19). Während  $-\Delta C10$  und  $-\Delta C16$  trotz intakter RKR-Sequenz weniger 14-3-3-Proteine binden können, ist es bei  $-AAA$  wohl die Tatsache der mutierten RKR-Sequenz. Vermutlich spielen der Bereich des Arginin-Signals bei der 14-3-3-Bindung ebenso eine Rolle wie weiter stromabwärts gelegene Sequenzen, möglicherweise in unterschiedlicher Ausprägung. Ob auch für die COPI-Bindung der distale C-Terminus benötigt wird, bleibt experimentell zu testen.

*In vitro* Bindungsexperimente mit in Bakterien exprimierten und über eine Hexa-Histidin-Sequenz am C-Terminus aufgereinigte tetrameren Kir6.2-Affinitätskonstrukte sowie einem zytosolischen Säugerzellextrakt bestätigten die in der Immunpräzitation gemachten Beobachtungen (Abbildung 20). Die Western-Blot-Membranen wurden mit einem 14-3-3-Antikörper detektiert, der alle Isoformen erkennt. Die schwächere obere Bande stellt Epsilon

dar, alle anderen Isoformen laufen auf der Höhe der prominenteren unteren Bande. Affinitätskonstrukte mit mutiertem Arginin-Signal ebenso wie mit verkürztem C-Terminus binden 14-3-3-Proteine schlechter als der vollkommen intakte Kir6.2-C-Terminus. Dabei scheint die Unversehrtheit bestimmter Aminosäuren im Bereich der letzten zehn Kir6.2-Aminosäuren für die Bindung nicht von Bedeutung zu sein, zumindest belegen das die Mutation des letzten Prolins zu Alanin bzw. in Kombination mit Leucin zu Glycin oder die Mutation der letzten vier Serine zu Alaninen. Diese Varianten vermögen 14-3-3-Proteine ebenso gut zu binden wie der unversehrte C-Terminus. Die Mutation der RKR-Sequenz zu Alaninen zeigt im Vergleich zur Mutation zu Lysin einen noch geringere 14-3-3-Bindung, was insofern nicht verwundert, als Lysine wie auch Arginine basisch hydrophil sind, Alanine jedoch hydrophob. Eine Kombination aus der Alaninmutation mit der Trunkation  $\Delta C10$  verursacht in gleicher Weise wie die Alaninmutation alleine einen kompletten Verlust der 14-3-3-Bindung. Interessanterweise ergeben sich z.T. andere Bindungsmuster, wenn man eine Coomassie-Färbung des SDS-Gels mit einer anti-14-3-3-Immundetektion eines Western-Blot-Transfers vergleicht. So erscheint im Coomassie-Gel bei  $-RKR\Delta C10$  und  $-RKR\Delta C16$  eine Bande in Höhe von Epsilon, die aber in der Immundetektion fehlt. Eine massenspektrometrische Analyse identifizierte die Bande als C1qR, ein 33kDa großes Typl-Zellmembranprotein, welches Homodimere ausbilden und unter anderem die Komplement-Komponente C1q binden kann. Zusammen mit Integrinen reguliert es die Zelladhäsion- und -ausbreitung von Endothelzellen (Fonseca et al, 2001; Feng und Tonnes, 2002), aber auch die Phagozytose in peripheren Blutzellen wie Monozyten, Neutrophilen (Nepomuceno und Tenner, 1998). In Neutrophilen z.B befindet sich C1qR wie auch andere Komplementrezeptoren in sekretorischen Vesikeln und wird auf ein Entzündungssignal hin zur Zelloberfläche transportiert (Segelov, 1995). Eine Verbindung zu Kir6.2 oder Arginin-Signalen ist nicht im Entferntesten zu erkennen. Es ist überhaupt erstaunlich, dass dieses Protein aus einem HeLa-Zellextrakt gezogen worden ist, nachdem Nepomuceno und Tenner die Anwesenheit in diesen Zellen experimentell ausschließen konnten. Ebenso verwundert die Tatsache, dass eine Immundetektion mit einem anti-C1qR-Antikörper nicht nur eine Bande in Höhe des Proteins detektiert, sondern auch die prominente 14-3-3-Proteine-enthaltende Bande. Die Möglichkeit, dass zu einem gewissen Teil auch  $-RKR$  dieses Protein binden kann, zeigt auch das Coomassie-Gel, welches im Bereich über 36 kDa zwei distinkte feine Banden aufweist. Zusätzlich zu der ehemals identifizierten Epsilon-Bande (Yuan et al, 2003), könnte die andere Bande C1qR darstellen. Bei den Affinitätskonstrukten mit verkürztem C-Terminus ist evtl. das Gleichgewicht zugunsten von C1qR verschoben. Ferner könnte eine durch Verkürzung oder Mutation (denn auch die Prolin-Mutationsvarianten zeigen eine C1qR-immunreaktive

Bande) eine strukturelle Veränderung bewirken, die das Gleichgewicht auf die Seite von C1qR verschiebt, ein Protein, das vermutlich unter nativen Umständen nicht an den C-Terminus von Kir6.2 bindet.

### **3.2.4.2 Mutationen im distalen Kir6.2-C-Terminus verändern Vorwärtstransport von multimeren Reportern in geringem Maße**

Nicht außer Acht gelassen werden darf die Anwesenheit eines Hexa-Histidin-Tags am C-Terminus aller zuvor beschriebenen Affinitätskonstrukte, welcher Einfluss auf die Bindeeigenschaften eines Proteins an den Kir6.2-C-Terminus haben kann. Aus diesem Grunde wurden die bisher nur in Bindungsexperimenten eingesetzten sowie weitere Kir6.2-Mutationsvarianten an CD4pLI fusioniert und ihr Einfluss auf das Oberflächenverhalten von tetramerem CD4 untersucht (Abbildung 21). Wie in Oberflächenversuchen zuvor, wurden die Werte auf die von  $-AAA$  normalisiert, da diese Variante stark an die Zelloberfläche transportiert wird. Ebenso effizient an der Oberfläche präsentiert wird die Kombinationsvariante aus  $-AAA$  und  $-\Delta C10$  und steht damit im Kontrast zu  $-RKR\Delta C10$  alleine (siehe Abbildung 17 und 18). In diesem Fall scheinen die fehlenden C-Terminalen Aminosäuren keinen Einfluss mehr auszuüben, die Mutation der ER-Lokalisationssequenz bestimmt den direkten Transport dieses Reporterproteins zur Plasmamembran. In etwa wie  $-RKR$  verhalten sich hingegen die Varianten, in denen entweder das letzte Prolin in Kombination mit dem Leucin zu Glycin ( $-P,L_G$ ) mutiert ist, oder die letzten vier Serine zu Alaninen ( $-S_A$ ), bzw. das erste Serin nach RKR ( $-RKRS_A$ ) bzw. alle Serine nach RKR zu Alaninen ( $-xS_A$ ). Von diesen Varianten weicht  $-P_A$  ab und erscheint mehr an der Oberfläche als  $-RKR$ . Proline induzieren eine Biegung des Peptids, so haben Coblitz et al dem Prolin in internen 14-3-3-Phospho-Serin/Threonin-Bindemotiven die strukturelle Rolle zugeordnet, Bindepartner aus der Bindungstasche herauszuführen. Das Serin nach der RKR-Sequenz (S372 im Kir6.2-Protein) ist eine von zwei Proteinkinase A-Consensus-Stellen im Kir6.2-C-Terminus (Beguin et al, 1999; Lin et al, 2000). Während Beguin et al das Serin als die Phosphorylierungs-sensitive Stelle handeln, sprechen Lin et al dem Threonin in Position 224 im Kir6.2-Protein diese Funktion zu. Die Tatsache, dass viele 14-3-3-Bindestellen (Mode I bis Mode III) in Membranproteinen phosphoryliert sind (Shikano et al, 2006) und der Sequenzbereich „LRKRSV“ in Kir6.2 dem in TASK1-C-Terminus („LMKRRSSV“) sehr ähnlich ist, wobei die Phosphorylierung des Serin vor dem Valin für eine TASK1-14-3-3-Interaktion und den effizienten Vorwärtstransport obligatorisch ist (O’Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002), implizierte eine möglicherweise ähnliche Bedeutung des Serins in Kir6.2. Doch die Kir6.2-Reportervariante, in der besagtes Serin durch Alanin ersetzt worden ist

(CD4pLI-RKRS\_A), zeigte das gleiche Oberflächenverhalten wie CD4pLI-RKR. Dieses Ergebnis könnte zum einen die Befunde von Lin et al (zumidest im Reporterprotein-Kontext) bestätigen, belegen auf jeden Fall aber einmal mehr indirekt, dass die Bindung von 14-3-3 an den Kir6.2-C-Terminus Phosphorylierungs-unabhängig ist (Yuan et al, 2003).

#### **3.2.4.3 Verkürztes Kir6.2-Reporterprotein lokalisiert in filamentären ER-Strukturen**

Während die Multimerisierung des Kir6.2-C-Terminus im CD4pLI-Reportersystem den Transport zur Plasmamembran ermöglicht, hat sie keinen positiven Einfluss auf die Kir6.2-Variante mit um zehn Aminosäuren verkürztem C-Terminus (Abbildung 17 und 18). Mittels Immunpräzipitations- und Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Verbleib dieses Reporters im Zellinneren mit einer verminderten Fähigkeit der 14-3-3-Bindung korreliert (Abbildung 19 und 20). Ferner haben Lokalisationsstudien von multimeren Kir6.2-Hefemembranreportern mit stromaufwärts verschobenem Stop-Codon in der Bäckerhefe *S.cerevisiae* den Verbleib der Proteine im ER belegt (mündliche Mitteilung von Kai Michelsen).

Immunfluoreszenzfärbungen von COS-1-Zellen, transient transfiziert mit CD4pLI-RKR und CD4pLI-RKR $\Delta$ C10, bestätigten zum einen den intrazellulären Verbleib der Trunktionsvariante und deckten zum anderen seine Lokalisation in ungewöhnlichen Strukturen auf. Sowohl Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD4, als auch gegen die Coiled-Coil-Domäne pLI färbten filamentäre, an Mikrotubuli erinnernde Strukturen im Zellinneren, die bei CD4pLI-RKR nicht zu sehen waren (Abbildung 22). Das ER in höheren Säugerzellen wird hauptsächlich in drei Subkompartimente unterteilt, dem Kernhüllen-ER, dem Ribosomen-bindenden rauhen ER und dem Ribosomen-freien glatten ER (Vedrenne und Hauri, 2006). Im Lichtmikroskop unterscheidet man hauptsächlich das Kernhüllen-ER von einem polygonalen retikulären ER-Netzwerk. Im Gegensatz zu CD4pLI-RKR erscheinen die ER-Strukturen von CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 aber nicht in feinen punktartig-retikulären, sondern in dickeren, eindeutig filamentären Strukturen. Kofärbungen mit Antikörpern gegen den *cis*-Golgi-Marker GM130 zeigten, dass sich die Strukturen weit über den Golgi-Bereich hinaus verteilen, die Kolo-kalisation mit YFP-markiertem Ramp4 belegte die ER-Herkunft dieser Strukturen. Doch CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 scheint nicht nur in diesen filamentären ER-Strukturen zu lokalisieren, sondern das gesamte (über Ramp4-YFP markierte) ER in solche Strukturen zu überführen. Die morphologische Ähnlichkeit mit Mikrotubuli-Bündeln veranlasste zu Experimenten mit dem Gift Nocodazol, welches Mikrotubuli depolymerisiert (Abbildung 23). Transfizierte und nicht transfizierte COS-1-Zellen wurden mit oder ohne Nocodazol behandelt und anschließend mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin und gegen pLI gefärbt. Der anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper markiert tubuläre Strukturen im

Zellinneren, die sich nach Nocodazol-Behandlung auflösen. Während sich die Lokalisation von CD4pLI-RKR durch Nocodazol nicht verändert, sind die filamentären CD4pLI-RKR $\Delta$ C10-markierten (ER-) Strukturen, die in unbehandelten Zellen eindeutig mit Mikrotubuli-Strukturen kolokalisieren, in Nocodazol-behandelten Zellen nicht mehr auszumachen. CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 markiert nun retikuläre Strukturen, wie sie bei CD4pLI-RKR zu sehen sind. Dieses Experiment belegt eindeutig, dass CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 im Zellinneren in ER-Strukturen lokalisiert, die mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert sind. Das ER höherer Eukaryoten ist ein dynamisches Netzwerk von miteinander verbundenen Membran-Strukturen, die fast das gesamte Zytoplasma durchdringen und eng mit dem Zytoskelett verbunden ist (Vedrenne und Hauri, 2006). So zieht sich das ER-Netzwerk unter Mikrotubuli- oder Mikrotubuli-assoziierte Proteine-störenden experimentellen Bedingungen ins Zentrum zurück (z.B. durch Überexpression des Proteins Tau, durch Depolymerisation von Mikrotubuli oder durch Suppression der schweren Kette von Kinesin, einem Motorprotein am „Plus-Ende“ von Mikrotubuli). Ferner ist gezeigt worden, dass ER-Membranen sich entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts ausdehnen können (Waterman-Storer und Salmon, 1998). Zur Aufrechterhaltung des ER-Netzwerks ist die Interaktion mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett von großer Bedeutung. So bewirkt die Überexpression des Typ II-ER-Membranproteins CLIMP-63, welches unter nativen Bedingungen nur in retikulären ER-Strukturen lokalisiert, ein Arrangement des ER entlang gebündelter Mikrotubuli durch die Vermehrung der Interaktionspunkte zwischen ER-Membranen und Mikrotubuli (Klopfenstein et al, 1998). Das in höheren Eukaryoten ubiquitär exprimierte, in niederen Eukaryoten wie Hefen, in denen die Aufrechterhaltung des ER hauptsächlich von Aktin-Filamenten und nicht von Mikrotubuli-Filamenten abhängt (Du et al, 2004), aber vollkommen abwesende CLIMP-63, wird wohl zur Stabilisierung der ausgedehnten ER-Membranen benötigt. CLIMP-63 bindet Zellzyklus-abhängig an Mikrotubuli und Überexpression von mutiertem CLIMP-63, welches nicht mehr an Mikrotubuli binden kann, verursacht einen Kollaps der ausgedehnten ER-Membranen in ähnlicher Manier wie Mikrotubuli- oder Mikrotubuli-assoziierte Proteine störende experimentellen Bedingungen (Ebneht et al, 1998). Möglicherweise vermittelt CLIMP-63 in Synergie mit dem Mikrotubuli-stabilisierenden Motorprotein Kinesin die aktive Extension der ER-Membranen entlang der Mikrotubuli und ist damit ein Schlüsselprotein für die ER-Struktur. Zahlreiche weitere Proteine wie z.B. Huntingtin, der Kinesin-Rezeptor Kinectin oder das ebenfalls als Rezeptor fungierende Vesikel-Membranprotein-assoziierte Protein (VAP)-B sind an der Mikrotubuli-assoziierten ER-Morphogenese beteiligt, die sowohl die Membran-Extension und Netzwerk-Stabilisation als auch die Retikulation und Modulation der ER-Form umfasst (Vedrenne und Hauri, 2006). Die mehrfach experimentell bestätigte Anwesenheit der  $K_{ATP}$ -

Untereinheit Kir6.2 in Insulin-sezernierenden Vesikeln sowie die Tatsache, dass diese Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden müssen und dieser Prozess möglicherweise das Mikrotubuli-Netzwerk involviert (Pouli et al, 1998), implizieren eine Verbindung zwischen Kir6.2 und Mikrotubuli. Die Translokation der Vesikel besonders in der zweiten langanhaltenden Phase der Insulin-Sekretion in  $\beta$ -Zellen scheint ferner abhängig zu sein von dem Motorprotein Kinesin, welches die Energie aus der ATP-Hydrolyse zum Zwecke des Cargo-Transportes entlang von Mikrotubuli nutzt (Varadi et al, 2002). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem ATP-Sensor  $K_{ATP}$  und den beschriebenen Komponenten der ER- bzw. Vesikel-Mikrotubuli-Interaktion. Überexprimiertes verkürztes Kir6.2-Reporterprotein verstärkt eventuell in Zellen, die kein Insulin sezernieren, die Interaktion zwischen dem ER und den Mikrotubuli, so dass ein Großteil des ER-Netzwerkes und des Mikrotubuli-Zytoskeletts kolokalisieren. Interessanterweise konnte auch in einigen wenigen Fällen eine Mikrotubuli-Bündeln-ähnliche Färbung in COS-1-Zellen detektiert werden, die den „Wildtyp“-Reporter CD4pLI-RKR überexprimierten. Es darf allerdings nicht vergessen werden, dass viele Proteine durch Überexpression die ER-Struktur künstlich verändern können und dass komplementäre Ansätze wie z.B. Inhibierung durch Herabregulierung benötigt werden, um die putativ morphogenetische Rolle eines Proteins zu untermauern.

### **3.2.5 C-terminale Trunkation der $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheit Kir6.2 beeinträchtigt die Maskierung des Arginin-Signals in der $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheit SUR1**

Die Trunktationsvariante CD4pLI-RKR $\Delta$ C10 vermag trotz Tetramerisierung nicht den Weg des Vorwärtstransportes einzuschlagen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weniger 14-3-3-Protein binden kann als der intakte Kir6.2-C-Terminus. Sie präsentiert ein intaktes Argininsignal bzw. ER-Lokalisationssignal und kann durch die Zurückhalte- oder –Zurückführungsmaschinerie der Qualitätskontrolle das Zellinnere nicht verlassen. Diese Kombination aus beeinträchtigter 14-3-3-Bindung in Anwesenheit (und Wirksamkeit) eines ER-Lokalisationssignals macht sie zum geeigneten Werkzeug, die Konsequenzen einer reduzierten 14-3-3-Bindung an Kir6.2 im Kontext funktioneller  $K_{ATP}$ -Kanalproteine zu studieren. Die Beteiligung von 14-3-3-Proteinen am Vorwärtstransport von  $K_{ATP}$ -Kanälen sowie die Rolle des Arginin-Signals sowie weiterer stromabwärts gelegener Aminosäuren im Kir6.2 C-Terminus sind gezeigt worden. Das fehlende Puzzleteil stellt SUR1 dar, seine Rolle beim Vorwärtstransport des Komplexes bzw. die Rolle seiner RKR-Sequenz und die notwendige Maskierung dieser.

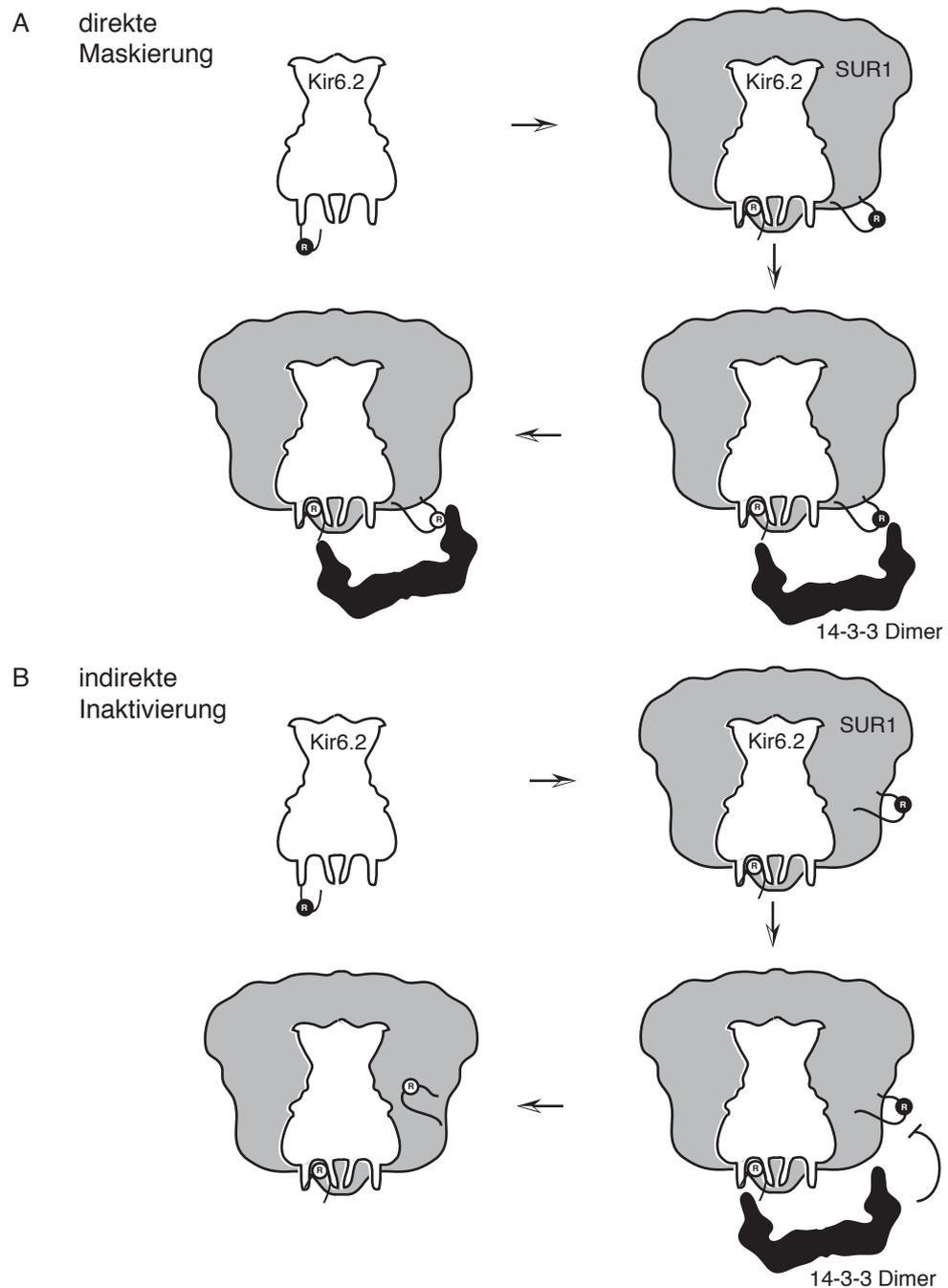
Die Trunkation  $\Delta C10$  wurde in ein SUR1-Kir6.2-Fusionsprotein eingefügt, in dem entweder die RKR-Signale in beiden  $K_{ATP}$ -Untereinheiten intakt oder in der SUR1-Untereinheit mutiert waren. SUR1-Kir6.2 Tandem-Fusionsproteine sind in der Lage funktionelle oktamere  $K_{ATP}$ -Kanäle auszubilden (Clement et al, 1997; Shyng und Nichols, 1997), durch die stete Anwesenheit beider Untereinheiten gelangen diese Proteine immer an die Zelloberfläche im Gegensatz zu den in Abwesenheit des Partners exprimierten einzelnen  $K_{ATP}$ -Untereinheiten (Zerangue und Schwappach et al, 1999). Die Verkürzung des Kir6.2-C-Terminus bei gleichzeitig intakten ER-Lokalisationssignalen führte zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenpräsenz des  $K_{ATP}$ -Kanals in COS-1 Zellen, die Mutation der RKR-Sequenz in SUR1 konnte diesen Effekt jedoch ausgleichen (Abbildung 24 (B)). Ergebnisse mit tetrameren Kir6.2-Reporterproteinen haben gezeigt, dass trunkierte C-Termini weniger 14-3-3 binden können. Bei der trunkierten Tandemfusionsvariante mit intakten Arginin-Signalen könnte es nun sein, dass mehrere Faktoren zu einem reduzierten Oberflächentransport führen: die beeinträchtigte 14-3-3-Rekrutierung an den verkürzten Kir6.2-C-Terminus in Kombination mit einer ebenfalls durch die Verkürzung hervorgerufene verschlechterte Maskierung von Kir6.2 durch SUR1. In der Variante mit mutiertem SUR1-ER-Lokalisationssignal ist die schlechtere 14-3-3-Rekrutierung zwar auch gegeben, doch ist kein aktives Signal in SUR1 mehr da, welches durch 14-3-3-Proteine bedeckt werden müsste und so kann der Komplex an die Zelloberfläche gelangen. Es scheint, als wäre insbesondere die Maskierung der SUR1-RKR-Sequenz von Bedeutung für den effizienten Vorwärtstransport. Dies stimmt mit Ergebnissen früherer Experimente überein, die daraufhin deuteten, dass das Arginin-Signal in SUR1 im funktionellen  $K_{ATP}$ -Komplex partiell exponiert ist (Zerangue und Schwappach et al, 1999).

### **3.2.6 Reduktion endogener 14-3-3-Proteine beeinträchtigt die Maskierung des Arginin-Signals in SUR1**

Für weitere Einblicke in die Bedeutung der Sortiersignale in den einzelnen Untereinheiten für den Gesamtproteinkomplex wurden außerdem Experimente in *Xenopus* Oocyten in Anwesenheit oder Abwesenheit des schon beschriebenen 14-3-3-Scavengerproteins durchgeführt (Abbildung 24 (C)). Die Oberflächenexpression von Tandem-Fusionsproteinen mit intakten RKR-Signalen oder mutierten RKR-Signalen bzw. von Fusionsproteinen, in denen jeweils nur das Signal einer der beiden  $K_{ATP}$ -Untereinheiten mutiert war, wurde in Anwesenheit von viel oder wenig verfügbarem 14-3-3-Protein gemessen.  $K_{ATP}$ -Kanäle mit durchweg aktiven ER-Lokalisationssignalen reagierten empfindlich auf die Reduktion endogener 14-3-3-Proteine

und zeigten eine deutlich verringerte Oberflächenpräsenz, gerade so wie die  $K_{ATP}$ -Kanäle, die aus unabhängig voneinander exprimierten Untereinheiten gebildet worden sind (siehe Abbildung 14). Diese Ergebnisse belegen erneut, dass die Maskierung der Signale alleine durch die korrekte Assemblierung der Untereinheiten nicht ausreicht, um einen effektiven Transport an die Plasmamembran zu ermöglichen. 14-3-3-Proteine sind notwendig, um die Signale in Kir6.2 und /oder SUR1 zu maskieren. Da SUR1<sub>AAA</sub>-Kir6.2<sub>AAA</sub> keine Argininsignale mehr aufweist, erfolgt der Vorwärtstransport trotz der durch R18 verursachten Reduktion der 14-3-3-Proteine auf effiziente Weise. Damit ist auszuschließen, dass 14-3-3-Proteine einen positiven Effekt auf den Vorwärtstransport *per se* haben. Wird nun die RKR-Sequenz in Kir6.2 mutiert, reagiert der Kanal auf die 14-3-3-Reduktion mit verringerter Oberflächenpräsenz. Im Gegensatz dazu macht eine Mutation der RKR-Sequenz in SUR1 den  $K_{ATP}$ -Kanal unempfindlich gegenüber einem niedrigen 14-3-3-Niveau.

Dass SUR1<sub>RKR</sub>-Kir6.2<sub>AAA</sub> jedoch in Anwesenheit endogener 14-3-3-Proteine die Oberfläche erreichen kann, belegt die Bedeutung der stromabwärts des Arginin-Signals gelegenen Aminosäuren für die 14-3-3-Bindung. Eine schwache 14-3-3-Bindung an die Sequenz außerhalb des RKR und/oder eine unterstützende Stabilisierung der 14-3-3-SUR1-Interaktion durch die Sequenz reicht vermutlich aus, um das ER-Lokalisationssignal in SUR1 zu maskieren. Wie schon erwähnt, scheint die RKR-Sequenz in SUR1 im assemblierten Komplex zugänglich zu sein und deshalb maskiert werden zu müssen. Das Argininsignal in Kir6.2 ist im  $K_{ATP}$ -Komplex vermutlich von SUR1 maskiert. Für diese Annahme spricht, dass Kir6.2 auch ohne SUR1 Tetramere ausbilden kann, diese aber im Zellinneren verbleiben (Tucker et al, 1997). Ferner haben strukturelle Analysen eines aufgereinigten  $K_{ATP}$ -Komplexes gezeigt, dass das Kir6.2-Tetramer von den SUR1-Untereinheiten eng umschlungen wird (Mikhailov und Campbell, 2005). Die Tatsache, dass Kir6.2-Tetramere alleine nicht vorwärts transportiert werden und auch nicht 14-3-3-Proteine binden können, kann weiterhin daraufhin deuten, dass durch die Assemblierung mit SUR1 Kir6.2-Tetramere eine Konformationsänderung erfahren, die eine Bindung der 14-3-3-Proteine an den Kir6.2-C-Terminus erlaubt.



**Abbildung 31: Modell für die funktionelle Inaktivierung der acht ER-Lokalisationssignale im  $K_{ATP}$ -Komplex.** Die dargestellten Formen illustrieren das Kir6.2-Tetramer (Antcliff et al, 2005), den heterooctameren  $K_{ATP}$ -Kanal-Komplex (Mikhailov und Campbell, 2005) und das 14-3-3-Dimer (Petosa et al, 1998). Sie basieren auf Homologie-Modellen oder Struktur-Analysen durch Einzel-Partikel-Elektronenmikroskopie oder Röntgenstruktur-Kristallographie. Die Größenverhältnisse stimmen mit der Realität überein. Die Position des 14-3-3-Dimers sowie der durch geschlossene (aktiv) bzw. offene (inaktive) Kreise dargestellten Arginin-Signale im Komplex sind komplett hypothetisch. Das ER-Lokalisationssignal in Kir6.2 wird im vollständig assemblierten  $K_{ATP}$ -Komplex durch SUR1 maskiert. Über den C-Terminus von Kir6.2 werden 14-3-3-Proteine rekrutiert. Nun kann über Kir6.2 rekrutiertes und evtl. zusätzlich über SUR1 selbst rekrutiertes 14-3-3-Protein das Arginin-Signal in SUR1 entweder direkt maskieren (A) oder aber RKR in SUR1 wird über zusätzlich rekrutierte Proteine (die z.B. die Vorwärtstransportmaschinerie (COPII) an den Komplex heranführen) indirekte inaktiviert (B) (siehe auch Heusser und Yuan et al, 2006).

### 3.2.7 Modell der funktionelle Inaktivierung der acht ER-Lokalisationssignale im $K_{ATP}$ -Kanal-Komplex (Abbildung 31):

Das ER-Lokalisationssignal in Kir6.2 wird im vollständig assemblierten  $K_{ATP}$ -Komplex durch SUR1 maskiert. Über den C-Terminus von Kir6.2 werden 14-3-3-Proteine rekrutiert. Nun kann über Kir6.2 rekrutiertes und evtl. zusätzlich über SUR1 selbst rekrutiertes 14-3-3-Protein das Arginin-Signal in SUR1 entweder direkt maskieren (Abbildung 31 A) oder aber zusätzliche Proteine wie z.B. solche der Vorwärtstransportmaschinerie (COPII) an den Komplex heranführen und somit eine indirekte Inaktivierung herbeiführen (Abbildung 31 B). In jedem Fall ermöglicht die vollständige Inaktivierung der ER-Lokalisationssignale in SUR1 durch 14-3-3-Proteine den Transport des  $K_{ATP}$ -Kanals an die Plasmamembran.

### 3.3 Einfluss eines Dileucin-Signals auf den Vorwärtstransport von Kir6.2-Reporterproteinen

Im Jahre 1992 machten Letourneur und Klausner die Beobachtung, dass eine zytosolische Domäne des T-Zell-Rezeptors zur effizienten Internalisierung eines Reporterproteins führen konnte, obwohl keine der bis dahin für die Endozytose als essentiell gehandelten Tyrosin-Aminosäuren anwesend war. Alanin-Mutagenese-Studien entlarvten ein auf zwei Leucinen beruhendes Motiv als endosomal-lysosomales Sortiersignal. Heute unterscheidet man zwei Klassen von Di-Leucin-Signalen, [DE]XXXL[LI] und DXXLL (Bonifacino und Traub, 2003). Während [DE]XXXL[LI]-Motive bei der Sortierung von vielen TypI-, TypII- und mehrfach die Membran-durchquerenden Transmembranproteinen eine Rolle spielen und verschiedene Adaptorprotein (AP)-Komplexe binden (wobei z.T. auch saure Aminosäuren vier oder fünf Positionen stromaufwärts des LL-Motivs eine Rolle spielen), finden sich DXXLL-Motive bei verschiedenen Transmembran- und anderen Proteinen, die sich zwischen dem TGN und Endosomen bewegen. Diese Motive, in denen sowohl die Asparaginsäure als auch die Leucine für die Funktion essentiell sind, werden nicht von AP-Komplexen, sondern von GGAs erkannt, einer Familie ARF-abhängiger Clathrin-Adaptoren, die im TGN und in Endosomen lokalisieren. Als Beispiel für ein [DE]XXXL[LI]-Motiv-tragendes Protein sei hier die invariante Kette  $\text{I}\beta 35$  des MHC-Klasse II-Komplexes genannt. Dieses Protein enthält nicht nur N-terminal die zwei Leucin-Paare „LI“ und „ML“ als Sortiersignale (Pond et al, 1995), sondern auch noch das starke ER-Lokalisationssignal „RRR“ (Schutze et al, 1994). In letztgenanntem Bereich binden sowohl

COPI-Komponenten als auch 14-3-3-Proteine, je nachdem, ob eine Serin-Stelle phosphoryliert ist oder nicht (O'Kelly et al, 2002). Die LL-Motive vermitteln die Sortierung von MHC-Klasse II-Komplexen ( $\alpha\beta\text{li}$ )<sub>3</sub> in späte Endosomen/Lysosomen, wo die invariante Kette vom Komplex durch (partielle) Degradation dissoziiert und die stabilen  $\alpha\beta$ -Dimere des Komplexes von exogenen Antigenen stammende Peptide binden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass für den Transport von MHC-Klasse II-Molekülen mit einer Variante von lip35 mit alternativem Start-Codon, aber gleichen LL-Motiven - lip33 – Clathrin und AP-2 und nicht AP-3 verantwortlich sind (Caplan et al, 2000; McCormick et al, 2005). Da der Adaptorprotein-Komplex-2 (AP-2) nur mit der Plasmamembran assoziiert ist, bedeuten diese Ergebnisse, dass eine signifikante Menge von MHC-II-Molekülen über einen indirekten Weg vom TGN über die Plasmamembran zu den Lysosomen gelangen. LL-Motive finden sich auch im Zusammenhang mit der Lokalisation von Membranproteinen in polarisierten Zellen, wobei diese Signale oft sowohl Endozytose als auch basolaterale Sortierung induzieren (Heilker et al, 1999). So sind zwei unabhängige N-terminale Motive, ein Di-Leucin- und ein Tyrosin-Signal, im Spannungs-abhängigen Kaliumkanal KCNQ1 für seine basolaterale Sortierung in MDCK-Zellen verantwortlich (Jespersen und Rasmussen et al, 2004). Auch der Spannungs-abhängige Kv4.2-Kanal enthält ein Di-Leucin-Motiv, wodurch er in Neuronen spezifisch in den Dendriten exprimiert wird. Diese Sortierung erfolgt vermutlich jedoch unabhängig von der Endozytose der Proteine (Rivera et al, 2003). Auch in der K<sub>ATP</sub>-Untereinheit Kir6.2 findet sich ein LL-Motiv stromaufwärts des Arginin-Signals (Zerangue und Schwappach, 1999) und die kombinierte Mutation von LL zu AA und RKR zu RAA ermöglichte dem monomeren Kir6.2-C-Terminus einen deutlich verstärkten Transport an die Zelloberfläche im Vergleich zu der Mutation des Arginin-Signals alleine. Dieser Befund in Kombination mit der Anwesenheit eines LL-Motivs in der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Untereinheit GB1, welche ebenfalls ein auf Argininen basierendes ER-Lokalisationssignal (RSRR) aufweist und wie Kir6.2 sowohl COPI als auch 14-3-3-Proteine binden kann (Margeta-Mitrovic et al, 2000; Couve et al, 2001; Brock et al, 2005; Restituto et al, 2006), veranlasste zu Experimenten mit multimeren Kir6.2-Reportern und monomeren GB1-Proteinen, in denen entweder beide Motive intakt, eines von beiden (zu Alaninen) mutiert oder beide Motive (zu Alaninen) mutiert waren. Solchermaßen klonierte CD4pLI-Kir6.2-Reporter wurden in COS-1-Zellen transfiziert und ihr Erscheinen an der Zelloberfläche gemessen (Abbildung 25). Während durch eine Mutation des Arginin-Signals alleine CD4pLI-LL-AAA stärker an die Oberfläche transportiert wird als der Reporter mit aktivem ER-Lokalisationssignal (LL-RKR), bewirkt die Mutation des LL-Signals alleine eine vollkommene Retention des Reporters im Zellinneren (AA-RKR). Die Mutation des LL-Motivs in AA-AAA wirkt noch verstärkend auf die durch Mutation des ER-Lokalisationssignals bedingte Exposition an

der Plasmamembran. Das LL-Motiv scheint in diesem Zusammenhang involviert in die Interaktion des Kir6.2-C-Terminus mit 14-3-3-Proteinen, entweder direkt durch die Ausbildung einer (niederaffinen) 14-3-3-Erkennungssequenz oder indirekt durch sterische Unterstützung der RKR-Bindestelle. Das LL-Motiv könnte auch für die (evtl. durch 14-3-3-vermittelte) Erkennung des Kir6.2-C-Terminus durch die Vorwärtstransportmaschinerie (z.B. COPII) wichtig sein und die Mutation von LL deshalb eine Retention im Zellinneren verursachen. Oder die künstlich eingeführten Alanine ermöglichen eine extrem stabile COPI-Bindung an die nahe gelegene RKR-Sequenz (Yuan et al, 2003) und eine dadurch hervorgerufene starke Rückführung des Proteins ins ER. Hu et al schreiben dem Di-Leucin-Motiv in Kir6.2 eine Bedeutung bei der konstitutiven und Proteinkinase C-vermittelten Internalisierung zu (2003). Untersuchungen von HA-markierten Kir6.2-Proteinen in COS-7-Zellen zeigten, dass Kir6.2 ohne die letzten 36 C-terminalen Aminosäuren bzw. mit zu Alaninen mutierten Leucinen unempfindlich auf die Behandlung mit dem Phorbolster PMA (induziert PKC-vermittelte Dynamin-abhängige Endozytose) reagierte, Kir6.2 mit zu Alaninen mutiertem ER-Lokalisationssignal jedoch empfindlich. Auch wurden  $K_{ATP}$ -Kanäle mit einer Alaninmutation der LL-Sequenz in der Kir6.2-Untereinheit vermehrt an die Zelloberfläche transportiert und reagierten nicht auf PMA-Behandlung. Die Tatsache, dass eine Mutation der Leucine in CD4pLI-AA-RKR nicht zu einer verstärkten Expression an der Plasmamembran führt, sondern im Gegenteil zu verstärkter Retention, spricht gegen „LL“ als ein Endozytose-Signal im Kontext der tetrameren Kir6.2-Reporterproteine. Ebenso berichten Mankouri, Taneja und Smith von der Bedeutung des auf Tyrosinen basierenden Motivs „YSKF“ stromaufwärts der LL-Sequenz bei der Clathrin-vermittelten Endozytose (2006). Diese Internalisierung wurde durch die Mutation von „YSKF“, aber nicht durch die Mutation von „LL“ verhindert. In dieser Publikation wird zwischen Internalisierung und Oberflächenexpression unterschieden, so kann HA-markiertes und mit SUR1 coexprimiertes Kir6.2-LL\_AA zwar verstärkt an die Oberfläche transportiert werden, wird jedoch genauso internalisiert wie Wildtyp-Protein, während Kir6.2-YSKF\_ASKF auch vermehrt an die Plasmamembran transportiert wurde, allerdings ohne endozytotische Aktivität vermitteln zu können, auch nicht nach PMA-Behandlung. Die Autoren vermuten, dass die Mutation des LL-Motivs eine durch vermehrtes Recycling zur Plasmamembran hervorgerufene verstärkte Oberflächenexposition hervorruft, wie es auch für andere Proteine mit LL-Signal wie den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor 46 oder Memapsin 2 vorgeschlagen worden ist (Tikkanen et al, 2000; He et al, 2005), bei denen dem LL-Signal eine wichtige Rolle bei der Sortierung der Proteine innerhalb des endosomalen Kompartiments zugedacht wird. Sowohl Hu et al (2003) als auch Mankouri und Kollegen (2006) untersuchten die Funktion des LL-Signals

entweder über Kir6.2-Proteine, die kein RKR aufwiesen ( $\Delta C26$ ) oder über mit SUR1 koexprimiertes Kir6.2-Protein. Auch wenn tetramere CD4pLI-Kir6.2-Proteine sich bisher als Reporterproteine für die Untersuchung von C-terminalen Signalen in Kir6.2 bewährt haben, ist eine durch die Assemblierung mit SUR1-hervorgerufene Anordnung der Kir6.2-Untereinheit bzw. die Maskierung der RKR-Sequenz doch mit Sicherheit von der Präsentation der Kir6.2-Schwänze im Reporterkontext verschieden und bedingt womöglich die Unterschiede im Oberflächenverhalten.

### **3.3.1 Einfluss des GEF mSec7-1 auf die Oberflächenexpression von LL-tragenden Membran -(Reporter-)Proteinen**

Das schon zuvor erwähnte LL-Signal in der GB1-Untereinheit des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors scheint auch hier nicht als Endozytosesignal zu fungieren, sondern vermittelt vielmehr die Interaktion zwischen GB1 und mSec7-1, einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für verschiedene ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs) (Restituto et al, 2005). ARFs sind kleine, zytosolische GTP-bindende Proteine und spielen beim Vesikeltransport (Aufrechterhaltung der ER- und Golgi-Kompartimente) und der Regulation des Zytoskeletts eine Rolle. ARF1-5 werden an den Golgi-Apparat rekrutiert, wo sie die Assemblierung von Mantelproteinen (Coatomer/COPI und Clathrin-AP1/AP-3) an Membranen stimulieren. ARF 6 unterscheidet sich von den anderen durch seine subzelluläre Lokalisation, die davon abhängt, ob es GTP gebunden hat (Plasmamembran) oder GDP (intrazelluläre Vesikelmembranen). ARF6 koordiniert die Regulation von Vesikeltransporten über die Umarrangierung von kortikalem Aktin-Zytoskelett in der Plasmamembran und recycelnden endosomalen Kompartimenten. Mitglieder der Zytosin-Familie wie mSec7-1 sind GEFs für ARFs, d.h. sie stimulieren die Freisetzung von GDP und ermöglichen dadurch GTP an ARF zu binden und es zu aktivieren (Jackson und Casanova, 2000). Zytosine besitzen eine Pleckstrin-homologe (PH) Domäne, welche durch die Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) als Verstärker der GEF-Aktivität wirkt, eine Coiled-Coil-Region und eine Sec7-Domäne, die für die GEF-Aktivität verantwortlich ist. mSec7-1, das Rattenhomolog zu humanem Zytosin-1, wird stark im Gehirn exprimiert und erscheint mit der Plasma- ebenso wie mit intrazellulären Membranen assoziiert. Es zeigt höchste GEF-Aktivität bei ARF1, 3 und 6 (Ashery und Koch et al, 1999). Restituto et al konnten in Bindungsexperimenten mit mSec7-1 und verschiedenen GB1-Mutatanten zeigen, dass die Interaktion der beiden Proteine von der Unversehrtheit des LL-Signals abhing (2005). Eine Koexpression in Säugerzellen ermöglichte die verstärkte Oberflächenexpression von GB1 mit

intaktem LL- und mutiertem RSRR-Signal (da sonst kein Oberflächentransport ohne die andere GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Untereinheit GB2 möglich ist). Um den möglichen Einfluss von mSec7-1 auf das LL-Signal in Kir6.2 und im Vergleich dazu auf „LL“ von GB1 zu untersuchen, wurden Oberflächenexperimente in COS-1-Zellen durchgeführt, die transient mit den verschiedenen HA-markierten GB1-Varianten +/- mSec7-1 oder mit den zuvor analysierten Kir6.2-Varianten +/- mSec7-1 transfiziert worden sind (Abbildung 26). Anders als bei Restituto et al reduzierte sich die Oberflächenexpression unter Koexpression von mSec7-1 für alle GB1-Varianten (die generell an die Oberfläche gelangen) auf die Hälfte, unabhängig von Unversehrtheit des LL- oder Arginin-Signals. Das gleiche Phänomen zeigte sich für die Kir6.2-Reporter. Die Präsenz aller Reporterproteine, die generell an die Plasmamembran transportiert wurden, verringerte sich um die Hälfte, ebenso in Unabhängigkeit von der LL- oder RKR-Sequenz. Da diese durch mSec7-1 hervorgerufenen Effekte auf das Oberflächenverhalten eher unspezifisch erschienen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von COS-1-Zellen durchgeführt, die sowohl die oben besprochenen Kir6.2-Reporter als auch mSec7-1 bzw. mSec7-1E157K (mSec7-1m in der Abbildung) exprimierten. Die Mutante mSec7-1E157K kennzeichnet eine reduzierte GEF-Aktivität (Huh et al, 2003). Antikörper gegen die pLI-Domäne erlauben die Detektion der Reporter in permeabilisierten COS-1-Zellen. Die Färbungen korrelieren mit der im Oberflächenassay gemachten Beobachtung der reduzierten Oberflächenexpression unter Koexpression mit aktivem mSec7-1. Eine Koexpression mit der mSec7-1-Mutante verändert die schon in Abbildung 25 gezeigte Lokalisation der Reporterproteine hingegen nicht. Interessanterweise lokalisiert CD4- (Abbildung 25) oder pLI-gefärbtes (Abbildung 25 und 26) CD4pLI-AA-RKR wie die Kir6.2-Variante mit verkürztem C-Terminus (CD4pLI-RKRΔC10) in Mikrotubuli-Bündel-ähnlichen Strukturen und diese ungewöhnlichen ER-Strukturen (siehe Diskussion 3.2.4.3) zeigen sich unbeeindruckt von mSec7-1. Die Antikörper gegen das Golgi-Protein GM130 markieren den Bereich des *cis*-Golgi, der durch Überexpression von mSec7-1 weniger kompakt erscheint als in den nur die Reporter exprimierenden Zellen (Abbildung 25) oder in Zellen mit überexprimiertem mSec7-1E157K (Abbildung 26). Eine Dreifachfärbung war mangels geeigneter Antikörper nicht möglich, eine Detektion von mSec7-1 bzw. mSec7-1E157K (myc-markiert, nicht dargestellt) zeigte jedoch die effektive Expression der GEF-Proteine. Eine Überexpression des GEF mSec7-1 scheint die Golgi-Strukturen in ähnlicher Weise zu verändern wie die Überexpression von ARNO, dem humanen mSec7-2-Homolog. Monier et al konnten zeigen, dass eine ARNO-Überexpression sekretorische Prozesse blockiert und zu einer Auflösung der Golgi-Struktur führt. Durch überexprimiertes ARNO wird verstärkt ARF1 aktiviert, was zu einer Blockade der COPI-vermittelten Transportereignisse (z.B. retrograder

ER-Golgi-Transport) führt (Franco et al, 1998). Während die Variante –AA-RKR unempfindlich gegenüber mSec7-1 ist, scheint für die anderen Kir6.2-Reporter die Veränderung des (*cis*-) Golgi eine Reduktion des Oberflächentransportes zu bewirken, was dafür spricht, dass –AA-RKR ausschließlich in (gegenüber verstärkter ARF-Aktivität unempfindlichen) ER-Membranen lokalisiert, während die anderen überexprimierten Reporterproteine den sekretorischen Weg einschlagen können.

Die von Restituito et al festgehaltenen Befunde der spezifischen Wirkung von mSec7-1 auf LL-Signale-tragende Membranproteine konnten weder reproduziert noch auf Kir6.2-Reporterproteine übertragen werden. Die einzigen experimentellen Unterschiede betreffen die Zelllinien (COS-1 bzw. COS-7), die Markierung des GB1-Proteins (HA- bzw. myc-) und die Zeit zwischen Transfektion und Oberflächenmessung (24h bzw. 48h), wobei man ausschließen kann, dass diese Unterschiede solche gegensätzlichen Ergebnisse produzieren können.

### **3.4 Mehrere ER-Lokalisationssignale kontrollieren den Vorwärtstransport von K2P-Kaliumkanälen**

Der Oberflächentransport der Dimere ausbildenden Zwei-Poren-Kaliumkanäle TASK1 und TASK3 wird von gegensätzlich wirkenden Bindepartnern kontrolliert, die Sequenz-Bereiche im zytosolischen N- bzw. C-Terminus erkennen. So bewirkt ein hoch konserviertes „KR“-ER-Lokalisationsmotiv im N-Terminus die Bindung des Coatomer-Proteins  $\beta$ -COP (O’Kelly et al, 2002). Ferner berichten Renigunta et al von einer C-terminalen Sequenz in TASK1, die durch die Bindung des Di-Lysin-Motiv-tragenden Proteins p11 ebenfalls eine Retention im Zellinneren verursacht (2006). Der Transport zur Plasmamembran dieser Kaliumkanäle involviert 14-3-3-Proteine, deren Vorwärtstransporteffekt für einen stetig wachsenden Kreis von Membranproteinen bzw. Membranproteinkomplexen beschrieben wird (Shikano et al, 2006; Mrowiec und Schwappach, 2006). 14-3-3-Proteine binden nach Phosphorylierung eines Serin-Restes einen Bereich im distalen C-Terminus (Mode III-Bindemotiv) von TASK1 bzw. TASK3 und ermöglichen dadurch den Weitertransport der Kanalproteine zur Zelloberfläche (O’Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002). Zur detaillierteren Charakterisierung des 14-3-3-Bindemotivs, welches durch die Anwesenheit von drei basischen Aminosäuren stark an das RxR-Motiv von Kir6.2 erinnert, wurden in dieser Arbeit verschiedene Reporterstrukturen aus dimerem Glykoprotein CD8 und C-terminalen Varianten von TASK1 und TASK3 kloniert. Luminometrische Messung des Oberflächenverhaltens in Säugerzellen belegten die Funktionalität der Fusion aus CD8 und dem intakten C-Terminus von TASK1, das

Reporterprotein wird an die Zelloberfläche transportiert (Abbildung 28). Die Entfernung der letzten Aminosäure bzw. der letzten fünf C-terminalen Aminosäuren reduzierte den Transport um mehr als die Hälfte. Dieses Ergebnis erstaunte insofern, als die Kaliumströme in korrespondierenden TASK1-Varianten TASK1 $\Delta$ C1 und TASK1 $\Delta$ C5 deutlich verschieden waren mit vernachlässigbarem Strom in  $\Delta$ C1 und einem zum Wildtyp-Kanal um die Hälfte reduzierten Strom in  $\Delta$ C5 (Ergebnisse Arbeitsgruppe Prof. Daut). Die Deletion der p11-Bindedomäne im Reporterproteinkontext verursachte den gegenteiligen Effekt des äußerst effektiven Oberflächentransportes. Wie schon von Renigunta et al beschrieben, vermittelt die p11-Domäne zusätzlich zum „KR“-Motiv im N-Terminus intrazelluläre Retention, da aber hier nur der C-Terminus untersucht wird und durch Deletion die Bindung an den Retentionsfaktor p11 nicht mehr gegeben ist, kann der Reporter effizient vorwärts transportiert werden. Eine Kombination aus CD8TASK1 $\Delta$ i20 ( $\Delta$ p11) und der Valintrunkation - $\Delta$ C1 führt zu einer stärkeren Retention als die Valintrunkation alleine. Die Kombination aus  $\Delta$ i20 und der Wegnahme der letzten fünf, das putative ER-Lokalisationssignal beinhaltenden Aminosäuren (- $\Delta$ C5) ermöglicht jedoch wieder einen mit CD8TASK1 $\Delta$ i20 vergleichbaren Transport zur Plasmamembran. Die Ergebnisse dieser Kombinationsmutanten korrelieren mit den Kaliumstrom-Messungen in korrespondierend mutierten TASK1-Kanälen. Frühere Publikationen haben gezeigt, dass der Serin-Rest vor dem Valin phosphoryliert wird und dass die letzte Aminosäure (das Valin) für die 14-3-3-Bindung benötigt wird, vermutlich, weil sonst die Erkennung des Serin durch die Kinase beeinträchtigt ist (O’Kelly et al, 2002; Rajan et al, 2002; Renigunta et al, 2006). Durch das Ausschalten der Retention durch p11 (durch Deletion der Bindestelle) wird der Fokus auf die Wirkung des putativen ER-Lokalisationssignals ermöglicht. Verhindert man nun die 14-3-3-Bindung an das Reporterprotein, bewirkt das tri-basische Motiv eine intrazelluläre Retention. Mit dem Entfernen weiterer und damit der basischen Aminosäuren entfernt man auch das Arginin-haltige Motiv und CD8TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C5 kann an die Oberfläche transportiert werden. Damit ist die Präsenz eines mit der 14-3-3-Bindestelle überlappenden ER-Lokalisationssignals in TASK1 bewiesen, wie es für die invariante Kette Ii35 und Kir6.2 bzw. K<sub>ATP</sub> existiert (Kuwana et al, 1998; O’Kelly et al, 2002; Yuan et al, 2003; Heusser und Yuan et al, 2006). Weiterhin belegen die Ergebnisse die schon für den K<sub>ATP</sub>-Kanal (siehe 3.2.6) postulierte Rolle der 14-3-3-Proteine als indirekte Vorwärtstransporthelfer bzw. –Vermittler. Ihre Aufgabe ist die Inaktivierung von Arginin-haltigen ER-Lokalisationssignalen, denn auch Reporterproteine, die kein 14-3-3 mehr binden können, werden an die Oberfläche transportiert. Unterschiede zwischen Reporterproteinen und TASK1-Kanälen können zum einen auf den unterschiedlichen Abstand der C-Termini zu den Transmembransegmenten, zum anderen auf

die Präsenz eines weiteren ER-Lokalisationsmotivs im N-Terminus des TASK1-Kanals zurückgeführt werden (O'Kelly et al, 2002).

Immunfluoreszenzfärbungen von mit den Reporterproteinen transfizierten COS-1-Zellen bestätigten das luminometrisch bestimmte Oberflächenverhalten. Die Reporterproteine mit deletierter letzter Aminosäure oder einer Deletion des ER- Lokalisations- bzw. 14-3-3-Bindemotivs erscheinen an der Plasmamembran, aber hauptsächlich intrazellulär in ER-/Golgi-Strukturen sowie in Vesikelcluster-artigen Punkten im Zellinneren. Die Kombination CD8TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C1 ist hingegen ausschließlich intrazellulär in über das gesamte Zellsoma punktförmigen Strukturen präsent. Kollokalisationsstudien mit Markern für den transmedialen Golgi ( $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase) und den *cis*-Golgi (Giantin) zeigten eine nur geringe Überlappung mit diesem Reporterprotein in Kern-nahen Bereichen (Ergebnisse der AG Daut). Möglicherweise stellen diese weit verteilten Strukturen Aggregate degradierter Proteine dar.

Da auch TASK3-Kanäle ein tribasisches putatives ER-Lokalisationssignal in ihrem distalen C-Terminus aufweisen, wurden in dieser Arbeit mit den oben beschriebenen Reportern vergleichbare CD8-Fusionskonstrukte kloniert und die Proteine einer Oberflächenanalyse unterzogen (Abbildung 29). Dimeres CD8TASK3-Protein erschien noch stärker an der Zelloberfläche exponiert als das Kontrollprotein CD8AAXX. Dies bestätigt die zuvor gemachte Beobachtung der deutlich besseren Expression von TASK3-Kanälen in Säugerzellen und *Xenopus* Oocyten im Vergleich zu TASK1-Kanälen (Renigunta et al, 2006). TASK3 besitzt im Gegensatz zu TASK1 keine p11-Bindedomäne und damit vermutlich einen Retentionsfaktor weniger. Das Entfernen des Valin oder der letzten fünf Aminosäuren des TASK3-C-Terminus reduzierte die Oberflächenexpression (wie bei TASK1) um etwa die Hälfte. Auch hier entspricht das Erscheinen an der Oberfläche nicht der in Oocyten gemessenen Kalium-Stromamplitude der vergleichbar trunkierten TASK3-Kanäle. Der Vergleich mit TASK1-Reportern, in denen die Deletion der p11-Domäne zum einen den bei nativen TASK1-Kanälen beobachteten Unterschied zwischen  $\Delta$ C1 und  $\Delta$ C5 imitieren konnte, was möglicherweise durch eine veränderte Nähe des C-Terminus zum Membranteil des Proteins und durch die Entfernung der p11-Retentionsfaktor-Bindedomäne verursacht worden ist, legte den Schluss nahe, dass die Verwendung eines Teils des TASK3-C-Terminus (die letzten 44 Aminosäuren) den gleichen Effekt haben könnte. Die Oberflächenexpression von CD8C44 belegte die Unversehrtheit des durch 14-3-3-Bindung hervorgerufenen Vorwärtstransportes des TASK3-Reporters. Die zusätzliche Trunkation des Valin bzw. der letzten fünf Aminosäuren erzeugte das exakt gleiche Bild des Oberflächentransportes wie schon bei CD8TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C1 bzw. CD8TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C5 gesehen: Die Wegnahme des Valins zerstört die 14-3-3-Bindestelle, so dass der Reporter

intrazellulär retentiert wird, weil nur noch das Arginin-haltigen Motiv wirkt; die Zerstörung des letztgenannten Motivs hebt die Retention auf und ermöglicht einen Transport an die Plasmamembran. Eine weitere Kontrolle für die Existenz des bei TASK1- sowie TASK3-Kanälen existierenden Arginin-haltigen ER-Lokalisationssignals stellt eine Variante dar, in der die zwei Arginine der Position -4 und -5 (im Wildtyp-C-Terminus) zu Alaninen mutiert sind und das letzte Valin fehlt (CD8C44RR\_AAΔC1). Dieser Reporter kann keine 14-3-3-Proteine mehr binden, wird aber auch nicht mehr intrazellulär durch ein Arginin-Motiv zurückgehalten und kann so effizient an die Zelloberfläche gelangen wie CD8TASK3.

Wie schon erwähnt, existieren auch in anderen Proteinen Arginin-haltige ER-Lokalisationsmotive, die mit einer 14-3-3-Bindestelle überlappen (Kuwana et al, 1998; Yuan et al, 2003) und die Phosphorylierung eines Serins in diesem Bereich verursacht eine effiziente Bindung an die 14-3-3-Proteine bei gleichzeitig verminderter Erkennung durch die COPI-Maschinerie (O'Kelly et al, 2002). So auch bei der invariante Kette 35 des MHC-Klasse II-Komplexes, an die 14-3-3-Proteine nach Phosphorylierung des Serin Nr.8 im N-Terminus (MHRRRSRS<sup>P</sup>C) binden können, wodurch das Arginin-haltige Signal „RRR“ laut O'Kelly et al außer Kraft gesetzt wird. Zur Untersuchung des für TASK1 und TASK3 von O'Kelly et al postulierten N-terminalen ER-Lokalisationsmotivs „KR“ wurde der N-Terminus von TASK1 (bzw. eine Mutante) anstelle des nativen N-Terminus der invariante Kette gesetzt (Abbildung 30). Die Messung der Oberflächenpräsenz des Wildtyp-Proteins lip35 zeigte eine starke Retention des Proteins im Zellinneren. Die invariante Kette muss erst mit anderen (β-Kette-) Untereinheiten des MHC-Klasse II-Komplexes assemblieren, um im Komplex vorwärtstransportiert werden zu können (Khalil et al, 2005). Die Mutation der Argininsequenz „RRR“ zu „SRS“ erlaubte hingegen einen Alleingang des Proteins an die Zelloberfläche. Die Fusion aus dem TASK1-N-Terminus mit intakter KR-Sequenz und lip35 reduzierte den Oberflächentransport um die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle „SRS“, die Fusion aus dem TASK1-N-Terminus mit zu „NQ“ mutiertem „KR“-Signal und lip35 ermöglichte hingegen eine mehr als doppelt so starke Oberflächenexposition. Die „KR“-Sequenz in TASK1 bzw. TASK3 (beide Proteine stimmen in den ersten neun, das Lysin und das Arginin enthaltenden Aminosäuren überein) funktioniert tatsächlich auch in einem anderen Proteinkontext als Di-basisches ER-Lokalisationssignal. Die Funktionalität in nativem TASK1-Kanal wurde von der Arbeitsgruppe Daut untersucht, TASK1 mit inaktivem ER-Lokalisationssignal (NQ) ermöglichte eine dreimal so hohe Amplitude des Kaliumstromes im Vergleich zum Wildtyp-Kanal mit aktivem ER-Lokalisationssignal (nicht dargestellt). Interessanterweise reduzierte sich der Kaliumionenstrom drastisch nach Deletion des Valins (siehe oben), allerdings vollkommen unabhängig von der Anwesenheit einer KR-

---

oder einer NQ-Sequenz im N-Terminus. Man kann daher von einer Dominanz des C-terminalen ER-Lokalisationsmotivs über das N-terminale sprechen, da selbst die Mutation des N-terminalen Motivs nicht zu einem verstärkten Oberflächentransport von solchen Kanälen führte, die kein 14-3-3-Protein mehr zur Maskierung des C-terminalen binden konnten.

Der Vorwärtstransport von TASK1 und TASK3 wird demnach über mehrere ER-Lokalisationssignale kontrolliert, über ein N-terminales Signal und ein (bei TASK3) bzw. zwei (TASK1) C-terminale Signale. Möglicherweise maskiert eine korrekte Dimerbildung das N-terminale Motiv, während 14-3-3-Proteine für die Inaktivierung des distalen C-terminalen Motivs zuständig sind. Der Retentionsfaktor könnte zusätzlich die Expression von TASK1-Kanälen in bestimmten Geweben feinregulieren. Über diese „doppelte“ bzw. „dreifache“ Absicherung wird gewährleistet, dass nur korrekt gefaltete und assemblierte K<sub>2</sub>P-Kanäle an den Ort ihrer Bestimmung gelangen. Ausgehend von den zwei intrinsischen ER-Lokalisationssignalen lässt sich die Qualitätskontrolle dieser Kanäle mit der von K<sub>ATP</sub>-Kanälen vergleichen, bei denen die korrekte Assemblierung des Kir6.2-Tetramers mit SUR1 zur Maskierung der RKR-Motive in Kir6.2, die Bindung von 14-3-3-Proteinen zur Inaktivierung der RKR-Motive in SUR1 führt.

## Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass 14-3-3-Proteine in Abhängigkeit von der multimeren Präsentation an den C-Terminus von Kir6.2-Proteinen binden können und weiterhin am Vorwärtstransport von  $K_{ATP}$ -Kanalkomplexen beteiligt sind, eröffnet eine Vielzahl von weiteren möglichen experimentellen Untersuchungen hinsichtlich der Interaktion dieser Proteine. So konnte z.B. indirekt gezeigt werden, dass 14-3-3-Proteine zur Maskierung des Arginin-Signals in SUR1 benötigt werden, doch eine direkte Interaktion ist noch nicht nachgewiesen worden. Weiterhin stellt sich die Frage, ob 14-3-3-Proteine eine Verbindung zwischen korrekt assemblierten  $K_{ATP}$ -Kanälen und der Vorwärtstransportmaschinerie herstellen, ob sie die Kanäle an ihren Bestimmungsort begleiten und dort möglicherweise weitere Funktionen neben der Maskierung der ER-Lokalisationssignale erfüllen. Die Untersuchungen zur Frage der 14-3-3-Isoformspezifität stehen erst am Anfang, hier gilt es systematisch nach dem Ausschlussprinzip unter Berücksichtigung der Gewebe-spezifischen Expression zu arbeiten, z.B. durch spezifische Herunterregulierung einzelner Isoformen. Ferner sollten weitere mögliche Lokalisationssignale wie das "LL"-Signal in Kir6.2 genauer analysiert werden, ebenso die Interaktion des Kir6.2-C-Terminus mit Komponenten der COPI-Vesikel. Welche Determinante bestimmt die Erkennung der Arginin-haltigen Sequenzbereiche durch COPI- bzw. 14-3-3-Proteine, ist es alleine die Multimerisierung oder spielen noch andere Faktoren eine Rolle? Welche Funktion haben 14-3-3-Proteine beim Oberflächentransport von  $K_{ATP}$ -Kanälen, die aus anderen Isoform-Untereinheiten gebildet werden, spielen sie z.B. eine Rolle bei der Entscheidung, ob SUR2B (Spleissvariante der Isoform 2) mit Kir6.1 oder mit Kir6.2 assembliert? Wie verhält es sich in anderen Kaliumkanälen mit multiplen ER-Lokalisationssignalen, bindet COPI auch an die Arginin-haltigen Sequenzbereiche im C-Terminus von TASK1 bzw. TASK3? Ist die Bindung von COPI-Komponenten und die Bindung von 14-3-3 in den Zwei-Poren-Kanäle wirklich ausschließlich und abhängig von der Phosphorylierung des Serin? Betrachtet man weiterhin Krankheiten-verursachende, den Transport an die Zelloberfläche betreffende Mutationen in Kaliumkanälen im Kontext der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen, eröffnet sich ein unendlich weites und interessantes Untersuchungsfeld.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Standardmedien, -Puffer und -Lösungen

Bezeichnung		Inhalt
<b>Annealingpuffer 2x</b>	0.04 M	Tris/HCl, pH 7.6
	0.06 M	NaCl
<b>Ampicillin Stocklösung</b>	100mg/ml	Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O; steril filtrieren; Aliquots bei -20°C lagern
<b>Bakterien-Agar (LB-Agar)</b>	15 g/l	Agar in LB- oder 2YT-Medium; autoklavieren,
	z.B. 80 µg/ml	Ampicillin
	z.B. 50 µg/ml	Kanamycin
<b>Blocking-Lösung für Western Blot</b>	1x	TBS in H <sub>2</sub> O
	5% (w/v)	Milchpulver
	0.02% (v/v)	NP-40
<b>Bindungspuffer</b>	50mM	Tris-HCl pH 7.5
	300mM	NaCl
	5mM	MgAcetat; bei 4°C lagern
<b>CHO-Zellmedium</b>		Nutrient Mixture F-12 (HAM) mit L- Glutamin
	10% (v/v)	FBS
	1% (v/v)	PenStrep; bei 4°C lagern
<b>COS-Zellmedium</b>		DMEM-21/F-12-Mix (1:1) ohne L-Glutamin
	10% (v/v)	FBS
	1% (v/v)	PenStrep
	2 mM	Glutamin; bei 4°C lagern
<b>Coomassie-/Fix-Lösung</b>	30% (v/v)	Ethanol absolut
	10% (v/v)	Essigsäure; zum Anfäben mit:
	0.2% /w/v)	Coomassie Brilliant Blue
<b>Cryokonservierungs-Medium Säugerzellen</b>		DMEM-21/F-12-Mix (1:1) ohne L- Glutamin
	35% (v/v)	FBS
	1% (v/v)	PenStrep
	2 mM	Glutamin
	10% (v/v)	DMSO; Aliquots bei -20°C lagern

Bezeichnung		Inhalt
DNA-Ladepuffer 6x	30% (v/v)	Ficoll 400
	0.25% (w/v)	Bromphenolblau
	0.25% (w/v)	Xylencyanol; in H <sub>2</sub> O
Doxycyclin Stocklösung	1 mg/ml	Doxycyclinsulfat in H <sub>2</sub> O; steril filtrieren; Aliquot bei 4°C lagern
Elutionspuffer für Bindungsexperimente	50 mM	Tris-HCl pH 7.5
	1.5 M	MgCl <sub>2</sub> ; H <sub>2</sub> O; bei 4°C lagern
Elutionspuffer für Proteinaufreinigung mit Ni-NTA-Agarose	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8
	1 M	NaCl
	500 mM	Imidazol
	5% (v/v)	Glycerin; H <sub>2</sub> O; bei 4°C lagern
HEK-Zellmedium		DMEM (+ Glutamax/ + 4,5g/l Glukose)
	10%	FBS
	1% (v/v)	PenStrep; bei 4°C lagern
Hefeagar	40 g/l	Bactoagar für Hefe in H <sub>2</sub> O oder YPAD; autoklavieren
Hefemedium YPAD	10 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Peptonwasserstoff
	40 mg/l	Adeninsulfat
	20 g/l	Glukose; H <sub>2</sub> O ad 1l; autoklavieren
Hefemedium selektiv	1.6 g/l	Hefestickstoffbasis
	0,57g/l	Aminosäuregemisch XY d.h. je nach Bedarf
	20 g/l	Glukose
		Aminosäuren XY d.h. je nach Bedarf:
	20 mg/l	L-Aginin; L-Methionin; L-Histidin; Uracil
	30 mg/l	L-Lysin; L-Tyrosin
	40 mg/l	Adeninhemisulfat
	50 mg/l	L-Phenylalanin; L-Tryptophan
	100 mg/l	L-Aspartat; L-Glutamat; L-Leucin
	150 mg/l	L-Valin
	200 mg/l	L-Threonin
375 mg/l	L-Serin	
	in H <sub>2</sub> O; steril filtrieren	
Hefeplatten	50% (v/v)	Hefeagar, autoklaviert
	50% (v/v)	Hefemedium steril filtriert

Bezeichnung		Inhalt
<b>INS-1 Zellmedium</b>	10% (v/v)	RPMI 1640 mit L- Glutamin
	1% (v/v)	FBS
	50 µM	PenStrep β-Mercaptoethanol; bei 4°C lagern
<b>Kanamycin Stocklösung</b>	50 mg/ml	Kanamycinsulfat in H <sub>2</sub> O; steril filtrieren; Aliquots bei -20°C lagern
<b>LB-Medium für Bakterien</b>	15 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl; H <sub>2</sub> O ad 1l; Nach dem Autoklavieren:
	z.B. mit 100 µg/ml z.B. mit 50 µg/ml	Ampicillin Kanamycin
<b>Lithium-Acetat-Stocklösung (10x)</b>	1 M	Lithium-Acetat pH 7.5 in H <sub>2</sub> O; autoklavieren
<b>Low Salt LB-Medium für Bakterien</b>	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl; H <sub>2</sub> O ad 1l; autoklavieren
	30 µg/ml	z.B. mit Zeozin
<b>LSE-Puffer</b>	25 mM	Tris-Hcl pH 7.5
	0.5 mM	Mg (OAc) <sub>2</sub>
	0.5 mM	EGTA
	150 mM	NaCl; bei 4°C lagern
<b>Mowiol-Einbettsubstanz</b>	6 g	Glyzerin
	2.4 g	Polyvinylalkohol (Mowiol 40-88) H <sub>2</sub> O ad 6ml; rühren
	12ml	Tris pH 8.5; 60°C für 10 Min; rühren bis homogen; 15 Min bei 5000xg RT; Aliquots bei - 20°C lagern
<b>PBS (phosphate buffered saline) 1x</b>	140mM	NaCl
	3 mM	Kcl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4; H <sub>2</sub> O ad 1l
<b>PEG-Stocklösung (50%)</b>	500 g/l	PEG (Polyethylenglycol) 4000 in H <sub>2</sub> O; steril filtrieren
<b>Pen/Strep für Zellkultur</b>	10000U/ml	PenG
	10000mg/ml	Strep

Bezeichnung		Inhalt
<b>Ponceau-S-Stocklösung 10x</b>	20 g/l 300 g/l 300 g/l	Ponceau-S Trichloressigsäure Schwefelsalicylsäure; in H <sub>2</sub> O
<b>Proteingel-Laufpuffer 5X</b>	250 mM 125 mM 0.1% (v/v)	Glycin pH 8.3 Tris 10% SDS H <sub>2</sub> O ad 1l
<b>Proteingel-Ladepuffer 5x</b>	250 mM 50% (v/v) 5% (v/v) 0.5% (w/v) 250mM	Tris-HCl pH 6,8 Glyzerin SDS 10% Bromphenolblau DTT (Dithiotreitol)
<b>Puffer H für Crosslinkexperimente</b>  z.B. mit	50mM 165mM 2mM 0.01 % (w/v)	HEPES-KOH pH 7.4 KOAc Mg (OAc) <sub>2</sub> Saponin
<b>SOC-Medium für Bakterien</b>	20 g/l 5 g/l 0.5 g/l 2.5 mM 10 mM 20mM	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl; H <sub>2</sub> O; nach dem Autoklavieren: MgCl <sub>2</sub> Glukose
<b>SDS 10%</b>	100g/l	Natriumdodecylsulfat
<b>Sortiermedium (für FACS)</b>	0.2% (v/v) 5% (v/v) 2% (v/v)	Nutrient Mix F-12 mit L-Glutamin FBS Dissoziationspuffer (Invitrogen) PenStrep; bei 4°C lagern
<b>T4-Ligase-Puffer 10x</b>	50 mM 10 mM 1 mM 1 mM 50 mg/ml	Tris-HCl pH 7,6 MgCl <sub>2</sub> ATP DTT PEG-8000; H <sub>2</sub> O; Aliquots bei -20°C lagern
<b>TAE-Puffer (DNA-Gel Laufpuffer) 20X</b>	800 mM 200 mM 20 mM	Tris-HCl pH 7,5 Na-Acetat EDTA pH 8

Bezeichnung		Inhalt
<b>TBS 10x</b>	240 mM 1.36 M 30 mM	Tris pH 7,4 (HCl) NaCl KCl; H <sub>2</sub> O ad 1l
<b>Transferpuffer 10x</b>	390 mM 480 mM 3.7 g/l	Glycin Tris pH 8,3 SDS; + 20% (v/v) Methanol in 1x Puffer
<b>Waschpuffer für Proteinaufreinigung aus Bakterien mittels Ni-NTA-Agarose</b>	50 mM 1 M 5-40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8 NaCl Imidazol; bei 4°C lagern
<b>2YT-Medium für Bakterien</b>	15 g/l 10 g/l 5 g/l 2% (v/v) 30 mM z.B. mit 100 µg/ml z.B. mit 50 µg/ml	Trypton Hefeextrakt NaCl Glyzerin Kaliumphosphatpuffer; H <sub>2</sub> O ad 1l Nach dem Autoklavieren: Ampicillin Kanamycin
<b>Zelllyse-Puffer Säugerzellen Standard</b>	25 mM 2 mM 1% (v/v) 10% (v/v) 1 Tablette/50 ml	Tris-Phosphat pH 7.8 DTT Triton X-100 Glyzerin Complete®Protease Inhibitor in H <sub>2</sub> O; Aliquots bei -20°C lagern
<b>Zelllyse-Puffer Säugerzellen für Immunpräzipitation</b>	25mM 150mM 1% (v/v)	Tris pH 7.5 NaCl Triton X-100; bei 4°C lagern
<b>Zelllyse-Puffer Säugerzellen für Crosslink-Experimente</b>	50mM 100mM 1% (v/v) 0.1% (v/v)	Tris-HCl pH 8.5 NaCl TX-100 10% SDS; bei 4°C lagern
<b>Zelllyse-Puffer Bakterien</b>	50 mM 1M 1 Tablette/50 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8 NaCl; bei 4°C lagern, vor Benutzung: Complete®Protease Inhibitor ohne EDTA in H <sub>2</sub> O

### 4.1.2 Enzyme

<b>Restriktionsenzyme</b>	<b>Hersteller</b>
AatII; AgeI; ApaI BamHI; BbsI; BglI; BglII; Bsp120I; BstAPI; BstBI; BstEII EcoR I; EcoR V Hind III; HpaI NcoI; NdeI; NgoMIV; NheI; NotI; NsiI PmeI; PstI SacI; SalI; SmaI; SpeI; SphI XbaI; XhoI	Fermentas und New England Biolabs
<b>Polymerasen und andere Enzyme</b>	
Expand High Fidelity DNA-Polymerase thermostabil	Roche
Pfu DNA-Polymerase thermostabil	Fermentas
Taq DNA-Polymerase thermostabil	AG Schwappach
CIP (Calf Intestine Phosphatase)	Fermentas
T4-DNA Ligase	Fermentas
T4-DNA Polymerase	Fermentas

### 4.1.3 Kits und andere Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Bradford Reagenz Protein Assay	BioRad
Complete® Protease Inhibitoren	Roche
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Bioscience
SuperSignal WEST Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Hybond™-ECL™ Nitrocellulosemembran	Amersham Bioscience
MobiCols Filtertubes 35 µm pore size	MoBiTec
Nucleo Spin® Plasmid Mini-Kit	Macherey-Nagel
Super Signal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche
ImmunoPure® Immobilized Protein A/G	Pierce
IgG Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
Ni-NTA Agarose	Quiagen

### 4.1.4 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Elektroporator, Gene Pulser® II	BioRad
Digitalkamera, ORCA-ER	Hamamatsu
Luminometer TD-20/20	Turner Designs
Mikroskop, Leica DM IRE2	Leica
PTC-200, Peltier Thermal Cycler	MJ Research
SDS-Elektrophorese-Apparaturen Mighty small	Amersham Bioscience
Sonifier 450	Branson
Tisch-Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultra-Zentrifugen	Beckman
Zentrifugen	Sorvall und Heraeus
Balch-Homogenisator	AG Wieland/Brügger BZH
FACS Aria (Fluoreszenzaktivierte Zellsortiermaschine)	BD Biosciences

#### 4.1.5 Antikörper

Name und Herstellungsorganismus	WB	OF	IP	IF	Herkunft
Kaninchen $\alpha$ GFP	1:2000				AG Görlich
Maus $\alpha$ HA (16B12)	1:1000	1:500	1:200	1:1000	BabCo
Maus $\alpha$ 14-3-3 $\beta$ (H-8)	1:1000				Santa Cruz
Kaninchen $\alpha$ 14-3-3 $\beta$ (K-19)	1:1000				Santa Cruz
Meerschweinchen $\alpha$ Kir6.2	1:1000		1:200	1:1000	AG Schwappach
Kaninchen $\alpha$ SUR1 (2441)	1:1000				AG Schwappach
Kaninchen $\alpha$ SUR1			1:1000	1:1000	AG Schwappach
Kaninchen $\alpha$ C1qR (H.190)	1:250				Santa Cruz
Maus $\alpha$ CD4 (EDU-2)		1:5000	1:500	1:1000	Dianova
Maus $\alpha$ CD4-APC		1:750			BD Biosciences
Kaninchen $\alpha$ CD4 (H-370)	1:1000				Santa Cruz
Maus $\alpha$ CD8 (UCHT-4)		1:5000		1:1000	Dianova
Kaninchen $\alpha$ CD8 (H-160)	1:1000				Santa Cruz
Maus $\alpha$ CD74 (li, Bu45)	1:1000	1:1000			AG Dobberstein
Kaninchen $\alpha$ Map1B (H-130)	1:1000				Santa Cruz
Maus $\alpha$ GM130	1:1000			1:1000	BD Biosciences
Maus $\alpha$ BIP/GRP78	1:500				BD Biosciences
Kaninchen $\alpha$ Insulin (H-86)				1:500	Santa Cruz
Maus $\alpha$ CPE	1:1000				Transduction Laboratories
Maus $\alpha$ $\beta$ -Tubulin (D-10)				1:1000	Santa Cruz
HRP-konjugierte IgG-Zweitantikörper Maus, Kaninchen, Meerschweinchen	1:5000	1:2000			Jackson Immunoresearch
AlexaFluor 488 bzw. 594-konjugierte IgG-Zweitantikörper Maus, Kaninchen, Meerschweinchen				1:500	BD Biosciences

#### 4.1.6 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5 $\alpha$	<i>hdsR17 supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) recA1 endA1 gyrA96 thi 1 relA1<math>\Delta</math></i>
BL21(Rep4)	<i><math>\Delta</math>(mcrA)183 <math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lac<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>

#### 4.1.7 Hefestämme

Name	Genotyp
Y00000 (Euroscarf)	BY4741, <i>MATa, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, met15<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0</i>
RRY1249 (Fink Labor)	<i>Sigma1278b, MATalpha, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG, bmh2::HIS3+, bmh1::HIS3+</i>

#### 4.1.8 Säugerzelllinien

Name	Herkunft
HEK293T	Embryonale Epithelialzellen aus <i>Homo sapiens</i> Nierengewebe
CHOmCAT1rtTAM2-CD2	Epithelialzellen aus <i>Cricetus griseus</i> Ovarien mit AS-Transporter MCAT1 und reversem Tet-System
INS-1	Zellen aus <i>Rattus norvegicus</i> $\beta$ -Pankreasgewebe
COS-1	Fibroblasten-ähnliche Zellen aus <i>Cercopithecus aethiopsis</i> Nierengewebe

#### 4.1.9 Oligonukleotide

##### 4.1.9.1 siRNA Oligonukleotide

	5' Ende	3' Ende
Kir6.2 635 sense	TTTGCCCGCTTCGTGTCCAAGAAAGTGAAGCCACAGATGTTTCTTGGACACGAAGCGGGCTTTT	
Kir6.2 635 antisense	CGAAAAAGCCCGCTTCGTGTCCAAGAACATCTGTGGCTTCACTTTCTTGGACACGAAGCGGG	
Kir6.2 989 sense	TTTGCGAGAATATCGTAGGGCTAGTGAAGCCACAGATGTAGCCCTACGATATTCTGCTTTTT	
Kir6.2 989 antisense	CGAAAAAGCAGAATATCGTAGGGCTACATCTGTGGCTTCACTAGCCCTACGATATTCTG	
Kir6.2 1684 sense	TTTGCATCTCTCCGGATTCTTGTGAAGCCACAGATGAAGGAATCCGGAGAGATGCTTTTT	
Kir6.2 1684 antisense	CGAAAAAGCATCTCTCCGGATTCTTCATCTGTGGCTTCAAGGAATCCGGAGAGATG	
SUR1 2918 sense	TTTGCGAGGAAGATGACAACTTGTGAAGCCACAGATGAAGTTGTCATCTTCCTCGCTTTTT	
SUR1 2918 antisense	CGAAAAAGCGAGGAAGATGACAACTTCATCTGTGGCTTCAAGTTGTCATCTTCCTCG	
SUR1 3830 sense	TTTGCCCTCACCTATGCCTTGATGTGAAGCCACAGATGATCAAGGCATAGGTGAGGCTTTTT	
SUR1 3830 antisense	CGAAAAAGCCTCACCTATGCCTTGATCATCTGTGGCTTCAATCAAGGCATAGGTGAGG	
SUR1 4392 sense	TTTGGATGCCATCATCACGGAAGTGAAGCCACAGATGTTCCGTGATGATGGCATCCTTTTT	
SUR1 4392 antisense	CGAAAAAGGATGCCATCATCACGGAACATCTGTGGCTTCACTTCCGTGATGATGGCATC	

## 4.1.9.2 Oligonukleotide für Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5' Ende	3' Ende
pBudoligo 3 R	CCACCGCATCCCCAGCATGCC
Nhe/5' U6pro F	CCCGCTAGCATCCGACGCCGCCATCTCTA
CD8EcoV F	GATATCTACATCTGGGCGCCCTTG
pLNCX 5' F	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCG
pLNCX 3' R	ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC
rSUR1-L12/13 F	CTGCTCAAGCACATGGTC
169 ( $\Delta$ C10) Xba/Xho R	GCTCTAGAGCCGCTCGAGTCAGGACAAGGAATCTGGAGAGAT
169 ( $\Delta$ C10) BamHI R	CGGGATCCGGGCTTGGCCTTCGCCACAGCCACACTG
172 ( $\Delta$ C16) BamHI R	CGGGATCCAGCCACACTGCGCTTGCAGAGGGGCCCGCGAC
CD4 end F	AAGACCTGCCAGTGCCCTCACCGGTTTCAG
pcDNA3 MCS R	GCTGATCAGCGAGCTCTAGCATTTAGG
36 LL_AA F	ATAAGAATGCGGCCGCGAGCCGAGATGCCCTGACCCTCGCCT
ABPCR R	ACACCTCTACCGGCATCG
mSec7-1PHend F	TGCATCAAAGCCGCCATCAGC
36 P_A BamHI R	CGGGATCCGGACAAGGAATCTGCAGAGATGCTAAACTTGG
36 P_A XbaI R	GCTCTAGATCAGGACAAGGAATCTGCAGAGATGCTAAACTTGG
36 PL_G BamHI R	CGGGATCCGGAGCCGGAATCTCCAGAGATGCTAAACTTGG
36 PL_G XbaI R	GCTCTAGATCAGGAGCCGGAATCTCCAGAGATGCTAAACTTGG
36 xS_A BamHI R	CGGGATCCGGCCAATGCATCTGGTGCAGATGGCAAACCTTGGGCTTGG
36 xS_A XbaI R	GCTCTAGATCAGGCCAATGCATCTGGTGCAGATGGCAAACCTTGGGCTTGG
TASK1 $\Delta$ C1 XbaI R	GCTCTAGATCATGAGCTCCTGCGCTTCATGAG
TASK1 $\Delta$ C5 XbaI R	GCTCTAGATCACTTCATGAGGCCGCGGAA
TASK1 Bsp120 F	CGGGGCCCAGATGACCATGAACGCCGAG
TASK1 Nt KR NotI	GGCCGCCGTGCGCACATTCTGCCGCTTCATGGTG
TASK1 Nt KR BamHI	GATCCACCATGAAGCGGCAGAATGTGCGCACGGC
TASK1 Nt NQ NotI	GGCCGCCGTGCGCACATTCTGCTGATTCATGGTG
TASK1 Nt NQ BamHI	GATCCACCATGAATCAGCAGAATGTGCGCACGGC
TASK3 C44 NotI F	ATAAGAATGCGGCCGCATCTTACAAGATCGAGGAGATC
TASK3 Bsp120 F	CGGGGCCCAGCTGACCATGAACAGTGAGGATC
TASK3 $\Delta$ C1RR_AAXbaI R	GCTCTAGATCAGGACTTGGCCGCTTTCATCAG
TASK3 $\Delta$ C1 XbaI R	GCTCTAGATCAGGACTTCCGGCGTTCATCAG
TASK3 $\Delta$ C5 XbaI R	GCTCTAGATCATTTTCATCAGCCTCTGGTG
36 HIS BamHI R	CTCTCCAGATTCTTGCCGGATCCCG
36TAGa (NotI) F	ATAAGAATGCGGCCGCACTGCTGGATGCCCTGACCC
T7 F	TAATACGACTCACTATAGGG

## 4.1.10 Expressionsplasmide

### 4.1.10.1 Säugerexpressionsplasmide

Name	Herstellung/Herkunft
pcDNA3 CD4-RKR	Labor Schwappach
pcDNA3 CD4-AAA	Labor Schwappach
pcDNA3 CD4-RKR $\Delta$ C10	diese Arbeit
pcDNA3 CD4-RKR $\Delta$ C16	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-RKR	Labor Schwappach
pcDNA3 CD8-AAA	Labor Schwappach
pcDNA3 CD8-RKR $\Delta$ C3	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-RKR $\Delta$ C10	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-RKR $\Delta$ C12	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-RKR $\Delta$ C14	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-RKR $\Delta$ C16	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR	Labor Schwappach
pcDNA3 CD4pLI-AAA	Labor Schwappach
pcDNA3 CD4pLI-RKR $\Delta$ C3	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR $\Delta$ C10	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-AAA $\Delta$ C10	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR $\Delta$ C12	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR $\Delta$ C14	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR $\Delta$ C16	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR-PL_G	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR-P_A	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR-S_A	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKR-xS_A	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-RKRS_A	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-AA-RKR	diese Arbeit
pcDNA3 CD4pLI-AA-AAA	diese Arbeit
pcDNA3 rKir6.2	Labor Shyng
pcDNA3 rSUR1	Labor Schwappach
pcDNA3 SUR-RKR-6.2-RKR	Labor Schwappach
pcDNA3 SUR-AAA-6.2-RKR	Labor Schwappach
pcDNA3 SUR-RKR-6.2-AAA	Labor Schwappach
pcDNA3 SUR-AAA-6.2-AAA	Labor Schwappach
pcDNA3 SUR-RKR-6.2-RKR $\Delta$ C10	diese Arbeit
pcDNA3 SUR-AAA-6.2-RKR $\Delta$ C10	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK1(Ct)	Labor Schwappach
pcDNA3 CD8-TASK1 $\Delta$ C1	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK1 $\Delta$ C5	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK1 $\Delta$ i20	Labor Schwappach
pcDNA3 CD8-TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C1	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK1 $\Delta$ i20 $\Delta$ C5	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK3 (Ct)	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK3 $\Delta$ C1	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-TASK3 $\Delta$ C5	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-C44 $\Delta$ C1	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-C44 $\Delta$ C5	diese Arbeit
pcDNA3 CD8-C44-RR_AA $\Delta$ C1	diese Arbeit

Name	Herstellung/Herkunft
pcDNA3 GB1-LL-RSRR	Labor Margeta-Mitrovic
pcDNA3 GB1-LL-ASRR	Labor Margeta-Mitrovic
pcDNA3 GB1-AA-RSRR	Labor Margeta-Mitrovic
pcDNA3 GB1-AA-ASRR	Labor Margeta-Mitrovic
pcDNA3 mSEC7-1	diese Arbeit
pcDNA3 mSEC7-1E157K	diese Arbeit
pcDNA3 RRR li	Labor Schwappach
pcDNA3 SRS li	Labor Schwappach
pcDNA3 KR-TASK1_li	diese Arbeit
pcDNA3 NQ-TASK1_li	diese Arbeit
pcDNA3Ramp4YFP	Labor Pepperkok
pBudCE4.1-U6	Labor Osten
pBudCE4.1-U6 Kir6.2-635	diese Arbeit
pBudCE4.1-U6 Kir6.2-989	diese Arbeit
pBudCE4.1-U6 Kir6.2-1684	diese Arbeit
pBudCE4.1-U6 SUR1-2918	diese Arbeit
pBudCE4.1-U6 SUR1-3830	diese Arbeit
pBudCE4.1-U6 SUR1-4392	diese Arbeit
pcDNA3 PGpLIR18	Labor Schwappach

#### 4.1.10.2 Hefeexpressionsplasmide

Name	Herstellung/Herkunft
p415 Met25 Pmp2CCYFP36T	Labor Schwappach
pRS306 Met25 h14-3-3 beta	diese Arbeit
pRS306 Met25 h14-3-3 eta	diese Arbeit
pRS306 Met25 h14-3-3 zeta	diese Arbeit
pRS306 Met25 h14-3-3 sigma	diese Arbeit
pRS306 Met25 h14-3-3 epsilon	diese Arbeit
pRS306 Met25 h14-3-3 gamma	diese Arbeit
pRS306 Met25 h14-3-3 tau	diese Arbeit

#### 4.1.10.3 Bakterienexpressionsplasmide

Name	Herstellung/Herkunft
pQE60 ZZ pLI RKR-His6	Labor Schwappach
pQE60 ZZ pLI KKK-His6	Labor Schwappach
pQE60 ZZ pLI AAA-His6	Labor Schwappach
pQE60 ZZ pLI RKR $\Delta$ C10-His6	diese Arbeit
pQE60 ZZ pLI RKR $\Delta$ C16-His6	diese Arbeit
pQE60 ZZ pLI AAA $\Delta$ C10-His6	diese Arbeit
pQE60 ZZ pLI RKR-PL_G-His6	diese Arbeit
pQE60 ZZ pLI RKR-P_A-His6	diese Arbeit
pQE60 ZZ pLI RKR-xS_A-His6	diese Arbeit

#### 4.1.10.4 Virale Expressionsplasmide

##### 4.1.10.4.1 Lentivirale Expressionsplasmide und Helferplasmide

<b>Name</b>	<b>Herstellung/Herkunft</b>
FUGWlinker	Labor Osten
FUGWlinker-U6	diese Arbeit
FUGWlinker-U6 Kir6.2-1684	diese Arbeit
FUGWlinker-U6 SUR1-2928	diese Arbeit
$\Delta$ 8.9	Labor Osten
VSVg	Labor Osten

##### 4.1.10.4.2 Andere Retrovirale Expressionsplasmide und Helferplasmide

<b>Name</b>	<b>Herstellung/Herkunft</b>
pRevTRE2	Clontech
pRevTRE2 PGpLIR18IRESGFP	Labor Schwappach
pRevTRE2 EGFPpLIR18	diese Arbeit
pVPack-GP	Stratagene
pVPack-Eco	Stratagene

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Allgemeine DNA-Techniken und Klonierungen

#### 4.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Für den Verdau von Vektoren werden 2-3 µg DNA, für DNA-Fragmente je nach Größe zwischen 3 und 10 µg in einem 30 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die Menge an Restriktionsenzymen (0.1 -1 Unit), die Temperatur (meist 37°C) während des Verdaus, die Inkubationszeit (meist 90 Min) und die adäquaten Puffer sind durch die Angaben der Enzymhersteller bestimmt. Nichtkompatible 5'-oder 3'-Enden können nach dem Verdau durch Zugabe von 3 µl Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs; 10mM je Nukleotid), 1 Unit T4-DNA-Polymerase und einer Inkubation von 20 Min bei 37°C aufgefüllt werden, so dass „glatte“ Enden entstehen, über welche die DNA-Ligation stattfinden kann.

Geschnittene Vektor-DNA wird (insbesondere bei Verdaus mit einem einzigen Enzym) nach der Restriktionszeit mit 1 Unit Alkalischer Phosphatase versetzt und für ca. 30 Min. bei 37°C inkubiert. Durch die Entfernung des Phosphatesters am 5'-Ende des Vektors wird die Möglichkeit der Religation eingeschränkt. Die Reaktion wird durch den Transfer in kältere Temperaturen (4°C oder -20°C) oder durch Zugabe von DNA-Ladepuffer gestoppt und die Reaktionsprodukte gelelektrophoretisch voneinander getrennt.

#### 4.2.1.2 Auftrennung von DNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Wird die angelegte Spannung gering gehalten, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer, doppelsträngiger DNA in einem Agarosegel umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes. DNA-Fragmenten werden in horizontalen Agarosegelen mit TAE-Laufpuffer elektrophoretisch voneinander getrennt. Die Prozentigkeit (von 0,8 % bis 2 %) des Agarosegels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente, je größer ein Fragment, desto niedriger die Prozentzahl. Die Agarose wird unter Hitzeeinwirkung (Mikrowelle, 900 Watt) in TAE aufgelöst, mit 2,5 µl (Stocklösung 10mg/ml) Ethidiumbromidlösung pro 50 ml Gelvolumen versetzt und in einen Rahmen gegossen. Durch das Aufsetzen eines Kammes wurden Taschen für die aufzutragenden Proben freigehalten. In die DNA interkaliertes Ethidiumbromid ermöglicht die Sichtbarmachung der Moleküle unter UV-Licht (302-366nm). Die Auftrennung erfolgt bei einer konstanten Spannung von 100-200 V. Als Molekulargewichtsstandard dient ein kommerzielle erworbener (1kb-) DNA-Marker mit Standard-DNA-Fragmenten. Das Laufverhalten bzw. die Laufgeschwindigkeit kann durch den gefärbten DNA-Ladepuffer verfolgt werden.

#### 4.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen

Die weiterzuverarbeitenden DNA-Fragmente werden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit einem Reinigungskit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Meist wird das Gel in Gegenwart eines chaotropen Salzes in hoher Konzentration bei 55°C geschmolzen, die DNA an eine Matrix gebunden und nach mehreren Waschschritten von dieser eluiert. Mit dem gleichen Kit werden PCR-Produkte gereinigt, der Schmelzschrift entfällt hierbei. Die gereinigte DNA kann für Ligationen, Transformationen etc. verwendet werden.

#### 4.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Lawyer et al, 1989; Saiki et al, 1988) dient der Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte. Eine zyklische Folge von verschiedenen Reaktionsschritten wird wiederholt, wobei sich in jedem Zyklus die Anzahl der spezifisch synthetisierten DNA-Moleküle verdoppelt. Es werden sogenannte Primer (Vorwärts- und Rückprimer) benötigt, also

Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren und dem 3'-bzw. 5'-Ende komplementär sind, sowie eine DNA-Matrize, dNTPs, eine thermostabile DNA-Polymerase und deren Puffer. Für analytische Zwecke (z.B. zur Überprüfung der korrekten Orientierung einklonierter DNA-Stücke) wird eine Taq-Polymerase verwendet, für alle anderen eine Polymerase mit sogenanntem Proofreading, einer Korrekturleseaktivität, die die Gefahr der Fixierung von Einbaufehlern und damit von Punktmutationen herabsetzt. Ein Reaktionsansatz von 50µl enthält je 400nM Vorwärts- und Rückprimer (2µl einer 10µM Primerlösung), 100ng DNA-Matrize, 600µM dNTPs (3µl einer 10mM dNTP-Lösung (2,5mM je Nukleotid)), 3-5 Units Polymerase (bei Taq weniger), 5µl 10fach-Puffer und steriles entsalztes H<sub>2</sub>O. In einem PCR-Zyklus wird die DNA durch Erhitzen denaturiert und nach Abkühlung binden die Primer an die DNA-Matrize (Hybridisierung oder Annealing). Dabei hängt die Annealing-Temperatur eines Primers von seiner Länge und seiner Basenzusammensetzung ab. G-C-Basenpaare bilden stärkere Wasserstoffbrückenbindungen aus als A-T-Basenpaare. Die unten aufgeführte Formel berücksichtigt diese Eigenschaften. Nach der Primerbindung verlängert die Polymerase diese Startermoleküle durch Einbau von Desoxyribonukleotiden (Elongation). Die Anzahl der Zyklen kann je nach Effizienz der PCR-Reaktion variiert werden.

PCR-Grundprogramm:

2 Min 94°C

20 Sec 94°C; 30 Sec T<sub>m</sub>-2°C; X Min 72°C                      24-30 Zyklen

5 min                      72°C

( T<sub>m</sub> [°C] = 4x(G+C) + 2x(A+T))

( X = pro kb zu amplifizierendes DNA-Stück ca. 1 Min)

PCR-Produkte werden entweder direkt mit einem Reinigungskit aufgereinigt oder erst auf ein Agarosegel geladen, ausgeschnitten und dann gereinigt.

Für analytische Zwecke ist auch die **Colony-PCR** geeignet. Der Reaktionsansatz ist dem oben aufgeführten nahezu identisch, es wird jedoch (statt Zugabe der DNA-Matrize) mit einer Pipettenspitze etwas von einer Einzelkolonie gepickt, im Reaktionsansatz gezwirbelt und schließlich in ein mit entsprechendem LB-Medium gefülltes Wassermannröhrchen gegeben. Nach erfolgter PCR und Auftrennung im Agarosegel lässt man nun nur die positiven Klone über Nacht bei 37°C wachsen, um am Folgetag die Plasmide zu präparieren.

#### 4.2.1.5 Hybridisierung von Einzelstrang-Oligonukleotiden

Um neusynthetisierte einzelsträngige Oligonukleotide in den Vektor zu integrieren, müssen sie doppelsträngig (hybridisiert) vorliegen. Synthetisierte Einzelstrangoligonukleotide (kodierender und nicht-kodierender Strang) werden mit sterilem, entsalztem H<sub>2</sub>O auf 100µM verdünnt, im Verhältnis 1:1 gemischt, mit einem speziellen Annealingpuffer (Material und Methoden) versetzt, für 5 Min bei 72°C erhitzt und anschließend langsam bis auf 37°C abgekühlt. Auf Eis wird die DNA 1:1000 verdünnt und schließlich 1µl davon in einer Ligation eingesetzt.

#### 4.2.1.6 Ligation von DNA-Molekülen

Linearisierte DNA-Moleküle können durch die Bildung von Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden miteinander verbunden werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert diese Reaktion unter Hydrolyse von ATP. Fragmente mit komplementären überhängenden Enden werden dabei effizienter verknüpft als Fragmente mit glatten Enden. In einem Reaktionsvolumen von 30µl werden 50-100ng des verdauten Klonierungsvektors mit einem 3-10fachen molaren Überschuss des oder der jeweiligen mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten einzuklonierenden Fragmente in Anwesenheit von 1-2 Units T4-DNA-Ligase und 3µl 10fach-Ligationspuffer inkubiert. Als Kontrolle dient stets ein Reaktionsansatz, der außer dem Vektor keine weitere DNA enthält. Die Ligation findet entweder

bei Raumtemperatur für 4h oder bei 18°C über Nacht statt. Im Anschluss wird die Ligase für 10 Min bei 65°C deaktiviert, wodurch sich die Effizienz der anschließend durchzuführenden Transformation um ein 10faches erhöht.

#### 4.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

4ml LB-Medium (mit Antibiotikum XY) werden mit einer Bakterieneinzelkolonie angeimpft und für 12-16h bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Die Bakterienkultur wird in ein Eppendorfgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Die weitere Plasmidpräparation erfolgt mit einem „Plasmid-Mini-Präparations-Kit“ nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode besteht in einem Aufschluss der Bakterien durch alkalische Lyse gefolgt von einer Ausfällung der SDS-solubilisierten Proteine und Bindung der DNA an eine Matrix. Nach mehreren Waschschrritten wird die Nukleinsäure mit einem Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die gewonnene Plasmid-DNA kann nun direkt in Zellen (Bakterien-, Säuger-, Hefezellen) transformiert werden oder für andere Klonierungszwecke weiterverwendet werden. Enthält die DNA einen über PCR hergestellten Sequenzabschnitt, wird die korrekte Sequenz durch Sequenzierung bei einer Fremdfirma verifiziert.

#### 4.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgt in Quarzküvetten mittels Ultraviolett-Absorptionsspektrophotometrie. Der Anteil der ultravioletten Strahlung, die von einer Nukleinsäure-Lösung absorbiert wird, ist ihrem Gehalt an Nukleinsäure direkt proportional. Das Lambert-Beer-Gesetz besagt, dass ein  $OD_{260}$ -Wert (Optische Dichte bei 260nm Wellenlänge) von 1, gemessen in einer Küvette mit einer Schichtdicke von einem Zentimeter, einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  Doppelstrang-DNA/ml in der Ausgangslösung entspricht (bei Einzelstrang-DNA 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; RNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Oligonukleotide 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Aromatische Aminosäuren und Phenol absorbieren Lichtwellen bei 280nm. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Probe, Protein-freie DNA weist einen Quotienten zwischen 1.8 und 2.0 auf.

### 4.2.2 Allgemeine Proteintechniken

#### 4.2.2.1 SDS-PAGE

Die von Laemmli et al entwickelte Methode der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erlaubt eine eine Auftrennung eines Proteingemisches anhand der Molekulargewichte der einzelnen Proteinkomponenten. Die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen in einer Polyacrylamid-Gelmatrix ist von ihrer Größe und Form abhängig und wird durch die Nettoladung des Proteins bestimmt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird von Proteinen quantitativ gebunden und bewirkt in Gegenwart von Thiolreagenzien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT eine zumeist vollständige Denaturierung der Proteine. Die Sulfatgruppen des SDS verleihen den Proteinen eine stark negative Gesamtladung, die der Masse des jeweiligen komplexierten Proteins proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in der SDS-PAGE wird so hauptsächlich durch den Siebeffekt der Gelmatrix und die angelegte Stromstärke bestimmt und korreliert sehr gut mit dem Molekulargewicht der Proteine. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese mit Sammel- und Trenngel gehen im erstgenannten Gel die in die Probenaschen pipettierten Proteingemische in das Gelsystem über, während im Trenngel die einzelnen Fraktionen voneinander getrennt werden. Die Acrylamid-Prozentigkeit des Trenngels wird an die Größe der aufzutrennenden Proteine angepasst, d.h. für Proteine mit größerem Molekulargewicht wählt man eine niedrige Prozentzahl. Die Prozentigkeit des Trenngels reicht im Allgemeinen von 5% bis 15% Acrylamid. Der Tris-Puffer des Trenngels hat einen pH-Wert von 8.8 und wird 0.375M eingesetzt, dazu kommt noch  $\text{H}_2\text{O}$  und 1%(w/v) SDS und 0.1%(w/v) APS. Nach der Zugabe des Polymerisations-Starters TEMED wird die noch flüssige Lösung zwischen zwei vertikal

stehende und durch Abstandhalter voneinander getrennte (Glas-)Platten gegossen, die in drei Richtungen durch Gummidichtungen begrenzt sind. Das mit Isobutanol-gesättigtem H<sub>2</sub>O (ermöglicht eine gerade horizontale Linie) beschwerte Gel lässt man bei RT auspolymerisieren, spült den Alkohol aus und überschichtet es mit dem Sammelgel. Das Sammelgel enthält in der Regel 5% Acrylamid, außerdem H<sub>2</sub>O, 0.125M Tris pH6.8, 0.1%(w/v) SDS, 0.1%(w/v) APS und TEMED als Starter der Polymerisation. In das Sammelgel wird ein Kamm mit x Zinken versenkt, so dass nach der Polymerisation Räume für die Proteinlösungen ausgespart sind. Das fertige Acrylamidgel wird vom Kamm befreit, in eine vertikale Gel-Apparatur gesetzt, mit SDS-Laufpuffer überschichtet und umspült und schließlich mit SDS-beladenen Proteinlösungen beladen. Als Größenstandard dient ein Gemisch aus gefärbten Proteinen mit definierter relativer Molekularmasse (20kDa bis 118kDa). Bei Minigel-Kammern (z.B. von Hoefer) erfolgt das Einlaufen der Proben bei maximaler Spannung und 15mA pro Gel, das Auftrennen bei maximaler Spannung und 30mA pro Gel. Der Verlauf der Auftrennung kann durch die Bromphenol-Färbung des Ladepuffers und die Bandenverteilung des Molekulargewichtsstandards verfolgt werden. Nach der Auftrennung wird das Trenngel aus den Glasplatten herausgelöst und kann z.B. mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder mittels Elektro-Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden.

#### 4.2.2.2 Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 bindet im sauren Milieu hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkung an freie, geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Es ergibt sich eine Korrelation zwischen der Farbstoffintensität und dem Lysin-, Arginin- und Histidinreste-Anteil des jeweiligen Proteins. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.2-1µg Protein pro Bande. Die Fixierung und Färbung kann in ein und derselben Lösung (siehe Material) erfolgen. Durch kurzzeitiges Erhitzen (z.B. in der Mikrowelle) erfolgt eine schnelle Färbung des Proteingels. Nach dem Abkühlen auf einem Schüttler muss die Flüssigkeit so oft ausgetauscht werden, bis die Proteinbanden in befriedigendem Maße sichtbar werden. Vor dem Ende der Entfärbung sollte nur noch mit H<sub>2</sub>O gewaschen werden, falls eine Konservierung des Gels durch Trocknung vorgesehen ist.

#### 4.2.2.3 Western Blot Detektion

Beim Western Blot werden die in dem Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, dadurch immobilisiert und können mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen werden (Towbin et al, 1979). Die Sensitivität liegt aufgrund der Antikörperspezifität deutlich über der der Coomassie-Färbung.

Das SDS-Trenngel, die Nitrozellulosemembran und Filterpapiere werden in Transferpuffer (siehe Material) equilibriert. Bei einem Semi-Dry-Blot wird auf der horizontalen Blotkammer (Anode unten) Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, das Proteingel und wieder Filterpapier möglichst luftblasenfrei übereinandergestapelt. Nach dem Anschließen einer Kathodenplatte erfolgt der Transfer in 50 Min bei maximal 25 Volt Spannung und 0.25 A pro Gel. Danach wird die Membran für 2 Min mit 1xPonceau-S gefärbt (zur Feststellung des Transfers), mit H<sub>2</sub>O gespült und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindestellen für 30 Min bei RT in Blocklösung (siehe Material) unter Schütteln inkubiert. Nach einstündiger Inkubation mit der mit einem Primärantikörper versetzten Blocklösung wird die Membran 3x in Blocklösung gewaschen (1x 20 Min, 2x 10 Min), 20 Min mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten und gegen den F<sub>C</sub>-Teil des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper (in Blocklösung) inkubiert, 3x in Blocklösung und 2x für 10 Min in TBS/0.02%NP-40 gewaschen. Die Membran wird kurz in H<sub>2</sub>O gespült, auf eine Klarsichtfolie platziert und zur Visualisierung der Proteinbanden für 2 Min mit einem verstärkt chemilumineszenten Substrat (z.B. ECL von Amersham) bedeckt. Nach Abtupfen von überschüssigem Substrat wird in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf der Membran exponiert und schließlich in einer Entwicklermaschine entwickelt. Der gegen den

Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper ist an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, welches die Oxidation des ECL-Substrates katalysiert, so dass Lichtsignale entstehen, die den Röntgenfilm dort schwärzen, wo sich das Protein befindet, an welches der Primärantikörper bindet.

#### 4.2.2.4 Messung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach einer Methode von Bradford (1976). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Eigenschaft des Coomassie-G-250-Farbstoffs, sein Absorptionsmaximum durch Anlagerung an Proteinmolekülen über hydrophobe Wechselwirkungen von einer Wellenlänge von 465 nm auf 595 nm zu verschieben. Die durch Proteine induzierte Erhöhung der Absorption einer Coomassie-Lösung ist direkt proportional zum Proteingehalt der Lösung. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit einer kommerziellen Färbelösung und nach der Vorschrift des Herstellers. Eichkurven werden unter Verwendung definierter Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) angelegt.

#### 4.2.3 Transformation von Bakterienzellen - Elektroporation

2.5  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Ligationsansatzes oder 1  $\mu\text{l}$  einer (auf ca. 0.5 ng/ $\mu\text{l}$ ) verdünnten Plasmidpräparation (zur Retransformation) werden mit 50 $\mu\text{l}$  elektrokompenten Bakterien in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. In einem Elektroporationsgerät findet die Elektrotransformation bei 400 $\Omega$  Widerstand, 25 $\mu\text{F}$  Kapazität und einer Spannung von 2,5 Volt statt. Durch diesen kurzen Hochspannungspuls werden die Bakterienzellwände perforiert, aber nicht zerstört und die exogene Plasmid-DNA kann aufgenommen werden. Sofort im Anschluss werden die Bakterien in 1ml SOC-Medium aufgenommen und für 20-60 Min. bei 37°C inkubiert (Regeneration). 0,1-1ml der Suspension werden auf eine LB-Agarplatte (mit Antibiotikum XY) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### 4.2.3.1 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Um Plasmide mittels Elektroporation in Bakterienzellen einbringen zu können, müssen die Bakterienzellen zuerst elektrokompent gemacht werden. 20 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) werden mit einer Bakterien-Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Ein Liter LB-Medium wird mit der Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5-0.7 (logarithmische Wachstumsphase) unter Schütteln inkubiert. Nach einer Ruhepause auf Eis von ca. 20 Min wird die Kultur für 5 Min bei 3000 Upm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 Liter eiskaltem sterilen und entsalztem H<sub>2</sub>O resuspendiert und weitere zwei Male gewaschen und abzentrifugiert. Im Anschluss werden die Zellen in 1L eiskaltem sterilen Glycerin (10%) aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Anschließend erfolgt die Resuspendierung in 2-4 ml (1/500 des ursprünglichen Kulturvolumens) eiskaltem sterilen Glycerin (10%) und das Schockfrieren (in flüssigem Stickstoff) von 50  $\mu\text{l}$  Aliquots, welche bei -80°C gelagert werden.

#### 4.2.4 Transformation von Hefezellen

Um Plasmide in die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* transient oder stabil einzubringen zu können, werden die Zellen mit alkalischen Kationen behandelt. Bei der Lithium-Acetat-Methode wird Hefemedium (YPAD-oder Selektivmedium) mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5-0.8 inkubiert (ca. 50 ml Kultur für 5 Transformationen). Die Zellen werden 5 Min bei 2000Upm pelletiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewaschene Hefezellpellet wird in Li-Acetat (1 Volumen-Anteil 1M Li-Ac, 1xTE und 8xH<sub>2</sub>O) aufgenommen (200 $\mu\text{l}$ /Transformation) und zu der schon vorgelegten DNA pipettiert. Die DNA-

Mischung besteht aus der zu transformierenden Plasmid-DNA (1 µg) und durch Hitze denaturierte Einzelstrang- Fisch-Spermien-DNA (180 µg), welche die Aufnahme erleichtern soll. Nach Zugabe von Polyethylenglykol (1.2ml/Ansatz; 8 Volumen-Anteile PEG, 1xLi-Ac, 1xTE) wird die Reaktion durch Vortexen gemischt und für 1h bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Im Anschluss werden die Zellen kurz an zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in H<sub>2</sub>O (100 µl) aufgenommen und auf eine Hefe-Selektiv-Platte ausgestrichen. Die meisten Hefekolonien wachsen bei 30°C. Für die stabile Integration von Plasmid-DNA ins Hefegenom werden spezielle Plasmide (z.B. pRS) vor der Transformation über Nacht mit einem Restriktionsenzym linearisiert, welches im Auxotrophiemarker schneidet (z.B. in LEU2). Die Teile des Auxotrophiemarker vermitteln die homologe Rekombination und integrieren zusammen mit dem zu integrierenden Gen ins Hefegenom und die Zellen, in denen wieder ein vollständiges Markergen entstanden ist, wachsen auf entsprechendem Selektivmedium.

## 4.2.5 Transfektion in Säugerzellen

### 4.2.5.1 Transiente Transfektion (Lipofektion)

Die Transfektion (*Transformation*, *Infektion*) ist eine Methode zur Inkorporation exogener DNA in Säugerzellen. Die Gene, die auf dem eingeführten Plasmid liegen, werden in der Zelle durch zelluläre Enzyme der transfizierten Zelle transkribiert und die Transkripte in ein Protein translatiert. Bei der transienten Transfektion kann das entsprechende Protein mehrere Tage bis zu einer Woche exprimiert werden. Die Plasmide können z.B. mittels Lipofektion (Transfektion mit Hilfe eines Lipid-Mixes z.B. FuGENE) in die Zellen eingebracht werden. Vor der Transfektion werden die Zellen passagiert (70-80% Konfluenz) und sich setzen gelassen (adhärieren) (> 4h). Sollen große DNA-Plasmide transfiziert werden, kultiviert man die passagierten Zellen über Nacht in einem Serum-freien Medium (Aushungern) und transfiziert erst am nächsten Morgen. Die zu transfizierende DNA-Menge hängt von der Zellzahl ab, wobei in der Regel 2 µg DNA für 10<sup>5</sup> Zellen (ein Loch einer 6-Loch-Zellkulturschale) ausreichen. In ein Reaktionsgefäß (Eppendorf-tube) mit vorgelegtem Serum-freiem Medium wird das Lipofektamin direkt hineinpipettiert, der Medium-Lipidmix für 5 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend auf die in einem anderen Reaktionsgefäß vorgelegte DNA gegeben. Nach kurzem Vortexen lässt man die Reaktion bei Raumtemperatur stehen und stoppt nach 15 Min mit 0.5 ml Vollmedium. Das Medium der passagierten Zellen wird abgesaugt, der Transfektionsansatz und weiteres Vollmedium hinzugegeben. Das Verhältnis von DNA zu Lipofektamin und Serum-freiem Medium beträgt 1:2.5:75, d.h. bei einer Plasmidmenge von 1 µg verwendet man 75 µl Medium und 2.5 µl Lipofektamin. Bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Inkubator erreicht die Proteinexpression nach 16-24h ihr Maximum.

### 4.2.5.2 Retroviraler Gentransfer

Die Verwendung retroviraler Expressionsvektoren ermöglicht die stabile Integration bestimmter DNA-Sequenzen an unbestimmten Orten des Genoms der Zielzellen. Hierfür werden in einer Tripeltransfektion der das gewünschte Konstrukt enthaltende retrovirale Expressionsvektor (pRevTRE2 oder der lentivirale Vektor FUGWinker) sowie bestimmte Helferplasmide in sogenannte Verpackungszellen eingebracht (z.B. HEK293T-Zellen). Der Vektor pRevTRE2 (tet-responsible element) erlaubt eine Doxycyclin-abhängige Proteinsynthese aufgrund eines auf den Doxycyclin-Transkriptivator ansprechenden Elements. Im Vektor FUGWinker (Flap, Ubiquitin-Promotor, GFP and WRE mit Linker-Region)-Vektor wird die GFP-Expression vom Ubiquitin-Promotor C kontrolliert, in die Linker-Region kann z.B. eine shRNA-Sequenzabfolge zusammen mit einem Promotor (U6) eingefügt werden. Helferplasmide für das lentivirale Expressionssystem sind Δ8.9 und VSVg. Letzteres trägt die Information für den

Glykoproteinmantel des Vesikulären Stomatitis Virus und vermittelt die Pseudotypisierung der viralen Partikel. Plasmid  $\Delta 8.9$  enthält die Gene *gag* (Gruppen-spezifisches Antigen), *pol* (Polymerase) und *env* (Envelope), welche für virale Strukturproteine einerseits und für eine RNA-abhängige Polymerase (reverse Transkriptase und Integrase in einem) andererseits kodieren. Im vom murinen Leukämie-Virus abgeleiteten retroviralen System erfüllen die Plasmide pVPack-Eco (steht für Ecotropes Verpacken) und pVPack-GP (*gag* und *pol*-Elemente) die Helferrfunktion. Mit dieser Plasmidkombination können die Verpackungszellen virale Partikel produzieren, die die gewünschten Konstrukte enthalten und sind in der Lage, einen Infektionszyklus, aber keine weitere Replikation zu durchlaufen.

Mit diesen Viruspartikeln können nun wiederum alle (im Falle des Lentivirus) Säugerzellen infiziert werden oder solche, die einen entsprechenden Rezeptor (den ecotropen Maus-Kationentransporter MCAT-1) präsentieren. Die RNA in den Partikeln wird in die Zellen eingeschleust, revers in DNA transkribiert und stabil ins Zellgenom integriert.

Die Tripeltransfektion entspricht der in 4.2.4.1 aufgeführten transienten Transfektion, dabei werden die Plasmide beim pRevTRE2/pV-System in gleicher Konzentration eingesetzt, beim der lentiviralen Transfektion jedoch im Verhältnis 1:7,5: 5 (Expressionsvektor:  $\Delta 8.9$ : VSVg).

Nach 10-12h Inkubation erfolgt ein Medienwechsel mit einer Verringerung des Volumens. Nach  $\Sigma$  36-48h wird der Überstand, in dem sich die Viruspartikel befinden, abgenommen und durch einen 0,45 $\mu$ m-Filter steril filtriert. Die lentiviralen Virionen werden durch Zentrifugation aufkonzentriert, in PBS aufgenommen und zu den Zielzellen (z.B. INS-1) gegeben. Im anderen System wird der gesamte virale Überstand der Verpackungszellen zusammen mit einer Polybren-Lösung (Endkonzentration 8 g pro ml) zu den Zielzellen gegeben (z.B. CHO<sub>MCAT-TAM2</sub>). 12h nach der Virusinfektion wird das gleiche Volumen an Vollmedium (+Polybren) zugefügt, 24h danach erfolgt ein kompletter Medienwechsel. Im Falle der Doxycyclin-abhängigen Expression (pRevTRE2) wird 24h vor der Analyse Doxycyclin von einer Stocklösung (1mg/ml in H<sub>2</sub>O, steril filtriert) in einer 1:1000 Verdünnung direkt ins Medium der Zielzellen gegeben. Die lentiviralen Verpackungs- und Infektionsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Pavel Osten in einem S2-Labor des MPI für experimentelle Medizin durchgeführt.

## 4.2.6 Allgemeine Techniken der Säugerzellkultur

### 4.2.6.1 Passagieren und Einfrieren von Säugerzellen

Alle zu verwendenden Lösungen und Medien werden im 37°C-Wasserbad vorgewärmt. Die Zellen werden 2x in PBS (-Mg<sup>++</sup>, -Ca<sup>++</sup>) gewaschen, mit 0.125% (w/v) Trypsin/EDTA in PBS für 2 Min im Inkubator trypsinisiert, evtl. durch Klopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst und mit Vollmedium versetzt um den Verdau zu stoppen. Die Zellen werden im Medium resuspendiert und ein Teil der Suspension wird in eine neue Zellkulturflasche überführt, in der Vollmedium vorgelegt ist. Zum Einfrieren der Zellen wird die gesamte Zellsuspension nach Überführung in ein 15ml Falconröhrchen für 3 Min bei 1000Upm sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1-2ml Einfriermedium (RPMI-Medium mit 10% DMSO) resuspendiert. Die Zell/Mediumsuspension wird in ein Einfriereröhrchen überführt, letzteres wird in einer spezielle Kältebox (mit Isopropanol; hier werden die Zellen pro Min um 1°C abgekühlt) in einen -80°C-Gefrierschrank gestellt. Für Langzeit-Aufbewahrung werden die Zellen in einen Tank mit flüssigem N<sub>2</sub> überführt.

### 4.2.6.2 Auftauen von Säugerzellen

Die Einfriereröhrchen mit den Zellen werden für ca. 2 Min in ein 37°C-Wasserbad gestellt und schließlich vollständig bei RT aufgetaut. Vorgewärmtes Zellmedium wird tropfenweise zu den Zellen in das Einfriereröhrchen gegeben und die Medium/Zellsuspension wird in ein 15ml Falconröhrchen überführt. Tropfenweise wird Medium hinzugegeben und mit den Zellen

vermischt bis das für die zu verwendende Kulturflasche entsprechende Volumen erreicht ist. Das Gesamtvolumen wird in die Kulturflasche überführt und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach ca. 4h bzw. wenn sich die Zellen gesetzt haben, wird ein Mediumwechsel vorgenommen.

#### **4.2.7 Präparieren von Säugerzellen für FACS-Analyse bzw. –Sortierung**

Transient transfizierte oder viral transduzierte Säugerzellen sowie Kontrollzellen werden wie in 4.2.5.1 beschrieben trypsinisiert und anschließend für 3 Min bei 1000Upm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in kaltem Vollmedium gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wird nun in Sortiermedium resuspendiert und die Zellsuspension durch eine spezielle Filterkappe in ein Sortierröhrchen überführt. Die Zugabe von Propidiumiodid (ad 1µg/ml) ermöglicht das Anfärben der toten Zellen. Falls eine Färbung der Zellen vor der Analyse notwendig ist (bei Verwendung von nicht-autofluoreszierenden Fusionsproteinen oder Markierungen), wird das Zellpellet nach dem 2. Zentrifugationsschritt in kaltem Vollmedium aufgenommen und ein Primärantikörper (evtl. mit einem Farbstoff z.B. Allophycocyanin gekoppelt) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1h auf Eis unter mehrmaligem Schütteln werden die Zellen erneut per Zentrifugation pelletiert, 2x in kaltem Vollmedium gewaschen und gegebenenfalls mit einem Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper für 30 Min gefärbt. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wird das Zellpellet wie oben in Sortiermedium aufgenommen und mit Propidiumiodid versetzt. Die Zellen können nun in einem Zellsortiergerät (FACS Aria) analysiert und sortiert werden. Im Falle der Sortierung werden Zellen in eine 6-Loch-Zellkulturplatte oder bei Einzelkonablage in eine 96-Lochplatte abgelegt. Nach Sedimentation der Zellen wird das Sortiermedium abgenommen und durch Vollmedium ersetzt. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **4.2.8 Proteinassays in Säugerzellen**

##### **4.2.8.1 Zellyse zur Extraktion von Proteinen**

Adhärente Säugerzellen werden 2x vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Standard-Lysepuffer (ca. 70µl für ein Loch einer 6-Loch-Zellkulturplatte) lässt man die Zellen auf einem Taumler für 30-60 Min bei 4°C lysieren, kratzt noch adhärierende Reste mit einem Gummischaber (Radiergummi) ab und überträgt die gesamte Suspension in ein Eppendorfgefäß auf Eis. Falls endogen exprimierte Proteine interessieren, kann die Zellyse auch in einem geringeren Volumen (z.B. 20µl) durchgeführt werden nachdem die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert, gewaschen und erneut zentrifugiert worden sind. Nach der Zellyse werden nicht-lysierte Zellkerne und DNA in einer Tischzentrifuge bei für 15 Min bei 13000Upm und 4°C sedimentiert (wenn man nur an cytosolischen oder Membran-Proteinen interessiert ist), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinmengen wird von jeder Probe 1µl in 1ml Bradfordreagenz gegeben und die Absorptionsverschiebung nach 15 Min bei 595nm photometrisch bestimmt. Entsprechend gleiche Mengen an Gesamtprotein werden entweder mit SDS-Proteinladepuffer (mit 100mM DTT) versetzt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

##### **4.2.8.2 Immunpräzipitation**

Die Methode der Immunpräzipitation basiert auf der Möglichkeit, bestimmte Matrixmoleküle (z.B. Sepharose oder Agarose) mit Proteinen (z.B. Protein A) oder Antikörperproteinen (Immunglobulinen) so zu koppeln, dass diese noch zu Antigen-Antikörperbindung bzw. Protein-Protein-Interaktion fähig sind und ihre Bindungspartner dadurch immobilisieren können. Für die Immunpräzipitation verwendet man hauptsächlich Zellysate, welche wie in 4.2.7.1 beschrieben hergestellt werden. Als „Input“-Kontrolle wird ein Aliquot (zwischen 5 und 10% des Volumens) vom Lysat abgenommen und mit SDS-Ladepuffer versetzt. Zum restlichen Zellysat gibt man

einen Primärantikörper (z.B. anti-CD4) und inkubiert unter Rotation für mindestens 4h (bis ÜN) bei 4°C. Nach Zugabe von in Lysepuffer equilibrierten ProteinA/G-Beads (50µl kompakte Beads können 25-250µg Antikörper binden) wird für weitere 2h unter Rotation inkubiert und schließlich das gesamte Volumen in verschließbare Filter-Gefäße (Mobicol-Filtertubes) pipettiert. Die Verwendung von Filtertubes ermöglicht intensives Waschen ohne Bead-Verlust. In den Mobicol-Gefäßen werden die Beads mindestens 4x mit Lysepuffer gewaschen und jedes mal in einer Tischzentrifuge bei 2000Upm jeweils 1 Min sedimentiert. Nach dem letzten Waschschrift erfolgt die Elution der über die Antikörper an die Beads gebundenen Proteine und ihrer Interaktionspartner. Man gibt SDS-Ladepuffer zu den Beads, kocht diese für 5 Min bei 95°C auf oder (im Falle von Membranproteinen, die unter Hitzeinwirkung aggregieren können) inkubiert sie für 20 Min bei 65°C und zentrifugiert im Anschluss für 2 Min bei 13000Upm in einer Tischzentrifuge. Die Eluate und die „Input“-Kontrollen können nun über SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Sollen vor einer Immunpräzipitation Komponenten miteinander vernetzt werden, werden die Zellen nicht durch Trypsinierung von den Kulturschalen gelöst, sondern durch Inkubation in PBS (-Mg<sup>++</sup>, -Ca<sup>++</sup>) für 10 Min im 37°C Inkubator. Nach Zentrifugation und erneutem Waschen in PBS wird das Zellpellet in Puffer H mit Saponin (siehe Material) resuspendiert, 10 Min bei RT stehen gelassen und schließlich mit 0.2mM DSS (Kreuzvernetzer Disuccinimidylsüberat) in DMSO bzw. mit DMSO alleine (als Kontrolle) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 Min bei 25°C im Schüttel-Thermoblock wird die Reaktion durch Zugabe von Puffer H ohne Saponin, DTT (10mM) und Glycin/KOH (90mM pH7.5) gestoppt. Die Zellen werden pelletiert (2Min bei 5000Upm) und in Lysepuffer (siehe Material ) aufgenommen. Der Solubilisierung ÜN bei 4°C folgt ein Zentrifugationsschritt von 30 Min bei 13000Upm und 4°C. Als „Input“-Kontrolle wird ein Aliquot vom Überstand abgenommen und der restliche Überstand wird wie oben beschrieben immunpräzipitiert.

#### 4.2.8.3 Chemilumineszenter Nachweis von Zelloberflächenproteinen

Die totale sowie die Oberflächen-Expression eines Membranproteins kann quantitativ mit einer chemilumineszenten Nachweismethode, ähnlich einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunoadsorbant assay, ELISA) erfasst werden.

Hierfür werden in 35mm-Schälchen ausplattierte (und evtl. transfizierte) Säugerzellen mit je 1ml 4% FA in PBS für 20 Min fixiert, 2x mit PBS gewaschen und 30 Min in 1ml Blocklösung (PBS/1%FBS) inkubiert. Ist nicht nur die Oberflächenexpression, sondern die Gesamtexpression des Proteins von Interesse, wird der Blocklösung das Detergens TritonX-100 (ad 0.3%) zugefügt, welches die Zellen permeabilisiert. Nach einem Waschschrift in Blocklösung werden die Zellen für 1h mit Blocklösung mit Primärantikörper (z.B. anti-CD4) inkubiert. Nach gründlichem Waschen in Blocklösung (mind. 5x; nach 0, 10, 20, 30, 40 Min.) wird für 20 Min mit Blocklösung mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, 4x in Blocklösung gewaschen (nach 0, 10, 20, 30 Min) und 5x in PBS (nach 0, 10, 20, 30, 40 Min). Schließlich wird ein luminogenes Substrat (z.B. Power Signal Elisa Solution von Pierce), welches von der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase unter Abgabe von Photonen umgewandelt wird, auf die Zellen gegeben und sofort die Intensität dieser Signale quantitativ in einem Luminometer bestimmt. Je mehr Protein an der Oberfläche oder insgesamt exprimiert wird, desto stärker wird das Signal, welches vom Luminometer in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen wird.

#### 4.2.8.4 Immunfluoreszenzfärbung von Säugerzellen

Auf einem runden Deckgläschen (Ø12mm) in einer 24-Loch-Kulturschale ausplattierte (und evtl. transfizierte) Säugerzellen werden in PBS gewaschen, mit PBS/2%FA/0.125M Saccharose für 20 Min bei RT fixiert, 1x in PBS gewaschen, für 10 Min in PBS/2%FA fixiert, 2x in PBS

gewaschen und gegebenenfalls mit PBS/0.3%TX-100/0.5%SDS für 15 Min permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird die Autofluoreszenz für 10 Min durch Zugabe von PBS/0.1MGlycin/0.1%NaBH<sub>4</sub> geblockt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörper-Interaktionen zu vermeiden, gibt man für mind 30 Min PBS/10%FBS zu den Zellen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (in PBS/5%FBS/0.01%NP-40) erfolgt für 2h bei RT oder ÜN bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Min in PBS/1%FBS wird für 1h bei RT (unter Aluminiumfolie) mit einem Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper (in PBS/5%Serum/0.01%NP-40) inkubiert. Dreimaliges fünfminütiges Waschen in PBS/1%FBS wird gefolgt von dreimal 5 Min Waschen in PBS. Letztlich wird das Deckgläschen mit einer feinen Pinzette aus der 24-Lochplatte gehoben, kurz in H<sub>2</sub>O getaucht, auf einem Filterpapier abgetropft und schließlich mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger eingebettet, auf dem ca. 15ml Einbettsubstanz (z.B. Mowiol, siehe Material) vorgelegt sind. Lichtgeschützt lässt man die Einbettsubstanz ÜN bei RT trocknen. Damit die Signale nicht so schnell verblassen, empfiehlt es sich, die Objektträger bei 4°C im Dunkeln aufzubewahren.

#### 4.2.8.5 Subzelluläre Fraktionierung von Säugerproteinen

Mit Hilfe von linearen Saccharose-Dichtegradienten können Organellen und Proteine fraktioniert werden, da jedes Organell (und die dort ansässigen Proteine) in den Bereich des Gradienten wandert, dessen Dichte mit der des Organells übereinstimmt. Für einen 10ml Saccharose-Gradienten von 0.4M bis 1.8M Saccharose werden 5ml einer 1.8M Saccharose-Lösung (4mM HEPES, pH7.4; 1mM EDTA) und 5 ml einer 0.4 M Saccharose-Lösung (4mM HEPES, pH7.4; 1mM EDTA) in die zwei Kammern eines Gradientenmischers gegeben und unter kontinuierlichem Rühren über ein Schlauchsystem in ein Zentrifugenröhrchen geleitet.

2x10<sup>8</sup> Säugerzellen werden wie in 4.2.6.1 beschrieben trypsinisiert und zentrifugiert, 1x in PBS (-Mg<sup>++</sup>, -Ca<sup>++</sup>) gewaschen, erneut zentrifugiert (3 Min bei 2000Upm), 1x in Lysepuffer (0.32M Saccharose; 4mM HEPES pH 7.4; Complete-Proteaseinhibitor ohne EDTA) gewaschen und schließlich in ca. 2ml Lysepuffer aufgenommen. Bei 4°C bzw. auf Eis wird die Zellsuspension 8x durch eine Spritze mit einer 20G-Nadel gezogen und im Anschluss 8x in einem kleinen Balch-Homogenisator (Kugel No 8.002) homogenisiert. Nach der Zugabe von EDTA (ad 1.5mM) wird das Zelllysate für 10 Min bei 3200Upm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig auf den Saccharosegradienten geladen. Die Fraktionierung erfolgt in einer Ultrazentrifuge bzw. einem Swingout-Rotor (z.B. SW40Ti) für 18h bei 25000Upm und 4°C. Von oben werden 0.5ml Fraktionen abgenommen, jeweils ein Aliquot pro Fraktion für die Dichtemessung abgezweigt und der Rest mit eiskaltem Ethanol versetzt (1.5 ml). Die Präzipitation der Proteine erfolgt ÜN bei -20°C. Am Folgetag werden die Proteine durch Zentrifugation (30 Min bei 13000Upm, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets nach Trocknung bei 37°C in SDS-Ladepuffer resuspendiert. Die Proteinproben können nun über SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western-Blot-Transfer immunodetektiert werden (siehe 4.2.2.3). Zur Kontrolle der Linearität des Saccharose-Dichtegradienten wird die Dichte der beim Abbau des Gradienten entnommenen Aliquots einer jeden Fraktion in einem Refraktometer gemessen.

#### 4.2.9 Proteinexpression und Proteinaufreinigung in Bakterien

Um Proteine in Bakterienzellen zu exprimieren und anschließend aufzureinigen, werden *E. coli* BL21(Rep4)-Zellen mit dem Expressionsvektor pQE60ZZ-XY-His6 (Ursprungsvektor pQE60; Quiagen) transformiert. Die Konstrukte enthalten C-terminal einen Tag aus sechs Histidinresten, um die rekombinanten Proteine über Nickel-NTA-Agarose Metall-affinitätschromatographisch aufzureinigen zu können. In dieser Matrix sind Nickelkationen (Ni<sup>++</sup>) als Chelatkomplex gebunden. Zwei freie Koordinationsstellen der Kationen können mit dem Hexahistidin wechselwirken. Das Protein XY ist weiterhin N-terminal mit einem doppelten Protein A- bzw. „Z“-Tag versehen („Z“

ist die B-Domäne von Protein A aus *Staphylococcus aureus*), welches die Fc-Region von humanem IgG binden kann. Die durch die pQE60-vermittelte hohe Proteinexpressionsrate in *E. coli* beruht auf dem T5-Phagen-Transkriptions-Translations-System. Der T5-Promotor enthält zwei lac-Operator-Sequenzen, die eine durch den lac-Repressor regulierte Expression von Proteinen ermöglichen. Eine Induktion der Proteinexpression wird durch Zugabe von IPTG, welches das lac-Repressorprotein inaktiviert, erzielt. Das lac-Repressorprotein wird in diesem Stamm durch das Plasmid pREP4 kodiert, wodurch eine konstitutive Proteinexpression unterdrückt wird.

#### 4.2.9.1 Proteinexpression

5 ml einer Übernachtskultur werden in 1L 2YT(+Amp/Kan)-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> 0.6-0.8 (90-150 Min) unter Schütteln inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wird IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und die Kultur für ca. 3 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von PMSF (ad 1 mM) werden die Zellen auf Eis heruntergekühlt und anschließend für 10 Min bei 3000Upm (GSA oder GS3) und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 20ml 2YT-Medium (+PMSF) resuspendiert und für 15 Min bei 5500Upm und 4°C erneut abzentrifugiert (Heraeus Megafuge). Nach dem Verwerfen des Überstandes kann das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren (und bei -20°C gelagert) oder direkt zur Aufreinigung herangezogen werden.

#### 4.2.9.2 Proteinaufreinigung

Das Bakterienzellpellet aus 4.2.9.1 wird in ca. 30ml Lysepuffer resuspendiert und (von Eiswasser umgeben) mittels Ultraschall aufgeschlossen (2x2Min full power; 30% DutyCycle). Zellfragmente werden für 90Min bei 48000Upm und 4°C abgetrennt (T50.2 oder T70; UZ), die Proteine werden aus dem Überstand aufgereinigt.

Säulen (Ø 1cm) werden mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen) bestückt und mit Lysepuffer equilibriert. Nach dem Auftragen des Bakterienlysates erfolgt das Waschen der Agarose mit 200ml Waschpuffer (siehe Material). Im Anschluss werden die Proteine nach Zugabe des Elutionspuffers (siehe Material) von der Matrix gelöst und in 30 Fraktionen à 0.3ml gesammelt. Das im großen Überschuss zum Zweck der Elution zugegebene Imidazol verdrängt das Protein von der Säule. Die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen (optisch bestimmt durch Tropfentest auf Nitrocellulosemembran und Färbung mit PonceauS) werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die endgültige Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt mit einem Bradford-Reagenz (siehe 4.2.2.4).

#### 4.2.10 Bindungsexperiment mit in Bakterien exprimierten Proteinen

An Sepharose-Beads gekoppeltes humane IgG ermöglicht die Immobilisierung von ProteinA- bzw. „ZZ“-markierten Fusionsproteinen. Das „ZZ“-Peptid hat eine Größe von ca. 14kDa und nur einen geringen Einfluss auf die Faltungseigenschaften des Fusionspartners. Für die Bindungsexperimente werden bakteriell exprimierte und wie in 4.2.9.2 aufgereinigte „ZZ“-Fusionsproteine mit einem Bindungspuffer (siehe Material) gemischt und zu mit Bindungspuffer equilibrierten IgG-Sepharose-Beads gegeben. Die Immobilisierung erfolgt unter Rotation bei 4°C für 3h oder ÜN. Das Bead-Protein-Gemisch wird in verschließbare Filtertubes (MobiCols) gegeben, bei 4°C und 2000Upm für 2 Min zentrifugiert und 2x mit Bindepuffer gewaschen. Cytosolische Säugerzellextrakte (aus HeLa-Zellen) oder aufgereinigte Proteine können nun zu den IgG-Beads gegeben werden, die schon die „ZZ“-Fusionsproteine gebunden haben. Die verschlossenen Filtertubes lässt man für mind. 4h bei 4°C unter Rotation inkubieren, wäscht dann mind. 4x mit LSE-Puffer (siehe Material), sedimentiert immer kurz bei 4°C und 2000Upm, zentrifugiert für 1Min trocken und gibt Hochsalz-Elutionspuffer (siehe Material) auf die Beads.

Die IgG-Protein A-Interaktion bleibt unter den gewählten Hochsalzbedingungen weitgehend bestehen, da sie auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Nach dem Resuspendieren durch kurzes Vortexen zentrifugiert man bei 8000Upm und 4°C für 2Min und wiederholt diesen letzten Schritt. Die eluierten Proteine werden durch Zugabe von eiskaltem absolutem Ethanol ÜN bei -20°C gefällt. Die in den Filtertubes verbliebenen IgG-Sepharosebeads werden mit SDS-Ladepuffer 5 Min aufgekocht und bei 13000Upm für 2 Min zentrifugiert. Die so durch SDS von der IgG-Sepharose unter denaturierenden Bedingungen gelösten „ZZ“-Fusionsproteine können über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet oder Coomassie-gefärbt werden und dienen der Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen des Köderproteins. Die über Nacht gefällten Proteine werden bei 4°C und 13000Upm für 30 Min durch Zentrifugation pelletiert, die getrockneten Proteinpellets dann in SDS-Ladepuffer resuspendiert, 5 Min aufgekocht und über SDS-PAGE getrennt. Die an die eingesetzten Fusionsproteine gebundenen Proteine (eines Zellextraktes oder anderer Herkunft) können durch Coomassie-Färbung der SDS-Gele sichtbar gemacht oder in einem Western Blot spezifisch mit Antikörpern detektiert werden, nachdem das SDS-Gel durch einem Elektro-Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert worden ist.

# Anhang

## **Publikationen:**

**Heusser, K. and Schwappach, B.** (2005). Trafficking of potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 364-9.

**Heusser, K., Yuan, H., Neagoe, I., Tarasov, A. I., Ashcroft, F. M. and Schwappach, B.** (2006). Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Cell Sci* **119**, 4353-63.

---

# Literaturverzeichnis

**Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J.** (1999). Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* **20**, 101-35.

**Aidley, D. and Stanfield, P.** (1996). Ion channels. Molecules in action. *Cambridge University Press*.

**Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. and Trono, D.** (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853-64.

**Anderson, R. A., Boronenkov, I. V., Doughman, S. D., Kunz, J. and Loijens, J. C.** (1999). Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J Biol Chem* **274**, 9907-10.

**Antcliff, J. F., Haider, S., Proks, P., Sansom, M. S. and Ashcroft, F. M.** (2005). Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *Embo J* **24**, 229-39.

**Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. and Wollheim, C. B.** (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**, 167-78.

**Ashcroft, F. M.** (2000). Ion channels and disease. *Academic Press*

**Ashcroft, F. and Rorsman, P.** (2004). Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough? *Hum Mol Genet* **13 Spec No 1**, R21-31.

**Ashcroft, F. M.** (2006). From molecule to malady. *Nature* **440**, 440-7.

**Ashcroft, F. M. and Gribble, F. M.** (2000). New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 439-45.

**Ashcroft, F. M., Harrison, D. E. and Ashcroft, S. J.** (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**, 446-8.

**Ashery, U., Koch, H., Scheuss, V., Brose, N. and Rettig, J.** (1999). A presynaptic role for the ADP ribosylation factor (ARF)-specific GDP/GTP exchange factor msec7-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1094-9.

**Barlowe, C.** (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* **13**, 295-300.

- Beguín, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gonoï, T. and Seino, S.** (1999). PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *Embo J* **18**, 4722-32.
- Bihn, E. A., Paul, A. L., Wang, S. W., Erdos, G. W. and Ferl, R. J.** (1997). Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize. *Plant J* **12**, 1439-45.
- Bonifacino, J. S. and Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.
- Bonifacino, J. S. and Lippincott-Schwartz, J.** (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 409-14.
- Bonifacino, J. S. and Traub, L. M.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bratanova-Tochkova, T. K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y. J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S. G., Yajima, H. and Sharp, G. W.** (2002). Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S83-90.
- Brock, C., Boudier, L., Maurel, D., Blahos, J. and Pin, J. P.** (2005). Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB Receptor is controlled by COPI but not 14-3-3. *Mol Biol Cell* **16**, 5572-8.
- Campbell, J. D., Sansom, M. S. and Ashcroft, F. M.** (2003). Potassium channel regulation. *EMBO Rep* **4**, 1038-42.
- Caplan, S., Dell'Angelica, E. C., Gahl, W. A. and Bonifacino, J. S.** (2000). Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules in human B-lymphoblasts deficient in the AP-3 adaptor complex. *Immunol Lett* **72**, 113-7.
- Cartier, E. A., Shen, S. and Shyng, S. L.** (2003). Modulation of the trafficking efficiency and functional properties of ATP-sensitive potassium channels through a single amino acid in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* **278**, 7081-90.
- Chan, K. W., Zhang, H. and Logothetis, D. E.** (2003). N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *Embo J* **22**, 3833-43.
- Cherry, S. R., Biniszkiwicz, D., van Parijs, L., Baltimore, D. and Jaenisch, R.** (2000). Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* **20**, 7419-26.

- Clement, J. P. t., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J.** (1997). Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* **18**, 827-38.
- Coblitz, B., Shikano, S., Wu, M., Gabelli, S. B., Cockrell, L. M., Spieker, M., Hanyu, Y., Fu, H., Amzel, L. M. and Li, M.** (2005). C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *J Biol Chem* **280**, 36263-72.
- Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S. and Li, M.** (2006). C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* **580**, 1531-5.
- Cook, D. L. and Hales, C. N.** (1984). Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271-3.
- Cook, D. L., Satin, L. S., Ashford, M. L. and Hales, C. N.** (1988). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* **37**, 495-8.
- Cosson, P. and Letourneur, F.** (1994). Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-31.
- Couve, A., Kittler, J. T., Uren, J. M., Calver, A. R., Pangalos, M. N., Walsh, F. S. and Moss, S. J.** (2001). Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* **17**, 317-28.
- Crane, A. and Aguilar-Bryan, L.** (2004). Assembly, maturation, and turnover of K(ATP) channel subunits. *J Biol Chem* **279**, 9080-90.
- Davey, R. A., Hamson, C. A., Healey, J. J. and Cunningham, J. M.** (1997). In vitro binding of purified murine ecotropic retrovirus envelope surface protein to its receptor, MCAT-1. *J Virol* **71**, 8096-102.
- Dean, P. M.** (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetologia* **9**, 115-9.
- Dedio, J., Renne, T., Weisser, M. and Muller-Esterl, W.** (1999). Subcellular targeting of multiligand-binding protein gC1qR. *Immunopharmacology* **45**, 1-5.
- Deeley, R. G., Westlake, C. and Cole, S. P.** (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* **86**, 849-99.
- Deeney, J. T., Kohler, M., Kubik, K., Brown, G., Schultz, V., Tornheim, K., Corkey, B. E. and Berggren, P. O.** (2001). Glucose-induced metabolic oscillations parallel those of Ca<sup>2+</sup> and insulin release in clonal insulin-secreting cells. A multiwell approach to oscillatory cell behavior. *J Biol Chem* **276**, 36946-50.

- Dittgen, T., Nimmerjahn, A., Komai, S., Licznanski, P., Waters, J., Margrie, T. W., Helmchen, F., Denk, W., Brecht, M. and Osten, P.** (2004). Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18206-11.
- Dougherty, M. K. and Morrison, D. K.** (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**, 1875-84.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. and MacKinnon, R.** (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Du, Y., Ferro-Novick, S. and Novick, P.** (2004). Dynamics and inheritance of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **117**, 2871-8.
- Durell, S. R., Hao, Y., Nakamura, T., Bakker, E. P. and Guy, H. R.** (1999). Evolutionary relationship between K(+) channels and symporters. *Biophys J* **77**, 775-88.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. and Mandelkow, E.** (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **143**, 777-94.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**, 6877-88.
- Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B. and Prentki, M.** (2000). Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* **49**, 718-26.
- Feiguin, F., Ferreira, A., Kosik, K. S. and Caceres, A.** (1994). Kinesin-mediated organelle translocation revealed by specific cellular manipulations. *J Cell Biol* **127**, 1021-39.
- Feng, X., Tonnesen, M. G., Peerschke, E. I. and Ghebrehiwet, B.** (2002). Cooperation of C1q receptors and integrins in C1q-mediated endothelial cell adhesion and spreading. *J Immunol* **168**, 2441-8.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fonseca, M. I., Carpenter, P. M., Park, M., Palmarini, G., Nelson, E. L. and Tenner, A. J.** (2001). C1qR(P), a myeloid cell receptor in blood, is predominantly expressed on endothelial cells in human tissue. *J Leukoc Biol* **70**, 793-800.

- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. and Chavrier, P.** (1998). ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9926-31.
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B. and Klein, D. C.** (2005). Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1222-7.
- Geng, X., Li, L., Watkins, S., Robbins, P. D. and Drain, P.** (2003). The insulin secretory granule is the major site of K(ATP) channels of the endocrine pancreas. *Diabetes* **52**, 767-76.
- Giles, N., Forrest, A. and Gabrielli, B.** (2003). 14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity. *J Biol Chem* **278**, 28580-7.
- Giraud, C. G. and Maccioni, H. J.** (2003). Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol Biol Cell* **14**, 3753-66.
- Goldstein, S. A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I. and Zilberberg, N.** (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* **2**, 175-84.
- Gommel, D. U., Memon, A. R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J. B., Nickel, W. and Wieland, F. T.** (2001). Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *Embo J* **20**, 6751-60.
- Gorlich, D. and Rapoport, T. A.** (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**, 615-30.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-6.
- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S. and Alber, T.** (1993). A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* **262**, 1401-7.
- Harter, C. and Wieland, F.** (1996). The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim Biophys Acta* **1286**, 75-93.
- Hauri, H. P., Nufer, O., Breuza, L., Tekaya, H. B. and Liang, L.** (2002). Lectins and protein traffic early in the secretory pathway. *Biochem Soc Symp*, 73-82.
- He, X., Li, F., Chang, W. P. and Tang, J.** (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem* **280**, 11696-703.
- Heilker, R., Spiess, M. and Crottet, P.** (1999). Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* **21**, 558-67.

**Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.** (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**, 3-11.

**Heusser, K. and Schwappach, B.** (2005). Trafficking of potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 364-9.

**Heusser, K., Yuan, H., Neagoe, I., Tarasov, A. I., Ashcroft, F. M. and Schwappach, B.** (2006). Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Cell Sci* **119**, 4353-63.

**Higgins, C. F.** (1995). The ABC of channel regulation. *Cell* **82**, 693-6.

**Higgins, C. F.** (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**, 205-10.

**Hu, K., Huang, C. S., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2003). ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C. *Neuron* **38**, 417-32.

**Huh, M., Han, J. H., Lim, C. S., Lee, S. H., Kim, S., Kim, E. and Kaang, B. K.** (2003). Regulation of neuritogenesis and synaptic transmission by msec7-1, a guanine nucleotide exchange factor, in cultured *Aplysia* neurons. *J Neurochem* **85**, 282-5.

**Jackson, C. L. and Casanova, J. E.** (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-7.

**Jaskolski, F., Coussen, F. and Mulle, C.** (2005). Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 20-6.

**Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Grunnet, M., Jensen, H. S., Angelo, K., Dupuis, D. S., Vogel, L. K., Jorgensen, N. K., Klaerke, D. A. and Olesen, S. P.** (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J Cell Sci* **117**, 4517-26.

**Jones, D. H., Ley, S. and Aitken, A.** (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* **368**, 55-8.

**Khalil, H., Brunet, A., Saba, I., Terra, R., Sekaly, R. P. and Thibodeau, J.** (2003). The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int Immunol* **15**, 1249-63.

**Klopfenstein, D. R., Kappeler, F. and Hauri, H. P.** (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *Embo J* **17**, 6168-77.

- Komatsu, M., Noda, M. and Sharp, G. W.** (1998). Nutrient augmentation of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent pathways in stimulus-coupling to insulin secretion can be distinguished by their guanosine triphosphate requirements: studies on rat pancreatic islets. *Endocrinology* **139**, 1172-83.
- Koster, J. C., Permutt, M. A. and Nichols, C. G.** (2005). Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K ATP) connection. *Diabetes* **54**, 3065-72.
- Kuwana, T., Peterson, P. A. and Karlsson, L.** (1998). Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1056-61.
- Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M. and Kellenberger, E.** (1970). Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **49**, 99-113.
- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D. H.** (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* **264**, 6427-37.
- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. and Schekman, R.** (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 87-123.
- Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C. and Cosson, P.** (1995). Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Cell Biol* **129**, 971-8.
- Letourneur, F. and Klausner, R. D.** (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-57.
- Lin, Y. F., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2000). Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *Embo J* **19**, 942-55.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnett, J. E.** (2001). Molekulare Zellbiologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin*.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-9.
- Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S. R., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2002). Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* **33**, 715-29.
- Mackintosh, C.** (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* **381**, 329-42.

- Majoul, I., Straub, M., Hell, S. W., Duden, R. and Soling, H. D.** (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell* **1**, 139-53.
- Mankouri, J., Taneja, T. K., Smith, A. J., Ponnambalam, S. and Sivaprasadarao, A.** (2006). Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes prevent endocytosis of ATP-sensitive potassium channels. *Embo J* **25**, 4142-51.
- Manning Fox, J. E., Nichols, C. G. and Light, P. E.** (2004). Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels by acyl coenzyme A esters involves multiple phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-interacting residues. *Mol Endocrinol* **18**, 679-86.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97-106.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Tuschl, T.** (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-74.
- McCormick, P. J., Martina, J. A. and Bonifacino, J. S.** (2005). Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7910-5.
- Mellman, I. and Warren, G.** (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**, 99-112.
- Michelsen, K., Mrowiec, T., Duderstadt, K. E., Frey, S., Minor, D. L., Mayer, M. P. and Schwappach, B.** (2006). A multimeric membrane protein reveals 14-3-3 isoform specificity in forward transport in yeast. *Traffic* **7**, 903-16.
- Michelsen, K., Yuan, H. and Schwappach, B.** (2005). Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* **6**, 717-22.
- Mikhailov, M. V., Campbell, J. D., de Wet, H., Shimomura, K., Zadek, B., Collins, R. F., Sansom, M. S., Ford, R. C. and Ashcroft, F. M.** (2005). 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *Embo J* **24**, 4166-75.
- Monier, S., Chardin, P., Robineau, S. and Goud, B.** (1998). Overexpression of the ARF1 exchange factor ARNO inhibits the early secretory pathway and causes the disassembly of the Golgi complex. *J Cell Sci* **111 ( Pt 22)**, 3427-36.
- Mrowiec, T. and Schwappach, B.** (2006). 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem* **387**, 1227-36.

- Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A. C., Scott, D. B. and Ehlers, M. D.** (2003). Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron* **40**, 581-94.
- Neagoe, I. and Schwappach, B.** (2005). Pas de deux in groups of four--the biogenesis of KATP channels. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 887-94.
- Nepomuceno, R. R. and Tenner, A. J.** (1998). C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol* **160**, 1929-35.
- Nichols, C. G.** (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470-6.
- Nichols, C. G. and Lopatin, A. N.** (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171-91.
- Nilsson, T., Jackson, M. and Peterson, P. A.** (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**, 707-18.
- Nothwehr, S. F. and Stevens, T. H.** (1994). Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J Biol Chem* **269**, 10185-8.
- Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, F., Paccaud, J. P., Tani, K. and Hauri, H. P.** (2002). Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J Cell Sci* **115**, 619-28.
- Nufer, O. and Hauri, H. P.** (2003). ER export: call 14-3-3. *Curr Biol* **13**, R391-3.
- O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N. and Goldstein, S. A.** (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-88.
- Olofsson, C. S., Gopel, S. O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P. and Eliasson, L.** (2002). Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* **444**, 43-51.
- Pagano, A., Letourneur, F., Garcia-Estefania, D., Carpentier, J. L., Orci, L. and Paccaud, J. P.** (1999). Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**, 7833-40.
- Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C. et al.** (2001). C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* **21**, 1189-202.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-58.

- Partridge, C. J., Beech, D. J. and Sivaprasadarao, A.** (2001). Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonylurea receptor causing familial hyperinsulinism. *J Biol Chem* **276**, 35947-52.
- Pawson, T. and Scott, J. D.** (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **30**, 286-90.
- Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. and Liddington, R. C.** (1998). *J Biol Chem* **273**, 16305-16310.
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. and Verma, I. M.** (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2140-5.
- Plant, L. D., Rajan, S. and Goldstein, S. A.** (2005). K2P channels and their protein partners. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 326-33.
- Pond, L., Kuhn, L. A., Teyton, L., Schutze, M. P., Tainer, J. A., Jackson, M. R. and Peterson, P. A.** (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* **270**, 19989-97.
- Pouli, A. E., Emmanouilidou, E., Zhao, C., Wasmeier, C., Hutton, J. C. and Rutter, G. A.** (1998). Secretory-granule dynamics visualized in vivo with a phogrin-green fluorescent protein chimaera. *Biochem J* **333 ( Pt 1)**, 193-9.
- Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J. and Barr, F. A.** (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J Cell Biol* **164**, 1009-20.
- Proks, P., Eliasson, L., Ammala, C., Rorsman, P. and Ashcroft, F. M.** (1996). Ca<sup>2+</sup>- and GTP-dependent exocytosis in mouse pancreatic beta-cells involves both common and distinct steps. *J Physiol* **496 ( Pt 1)**, 255-64.
- Rabouille, C. and Klumperman, J.** (2005). Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 812-7.
- Rajan, S., Preisig-Muller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanley, P. J., Renigunta, V., Musset, B., Schlichthorl, G., Derst, C., Karschin, A. et al.** (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* **545**, 13-26.
- Remedi, M. S., Rocheleau, J. V., Tong, A., Patton, B. L., McDaniel, M. L., Piston, D. W., Koster, J. C. and Nichols, C. G.** (2006). Hyperinsulinism in mice with heterozygous loss of K(ATP) channels. *Diabetologia* **49**, 2368-78.

- Ren, Z., Riley, N. J., Garcia, E. P., Sanders, J. M., Swanson, G. T. and Marshall, J.** (2003). Multiple trafficking signals regulate kainate receptor KA2 subunit surface expression. *J Neurosci* **23**, 6608-16.
- Renigunta, V., Yuan, H., Zuzarte, M., Rinne, S., Koch, A., Wischmeyer, E., Schlichthorl, G., Gao, Y., Karschin, A., Jacob, R. et al.** (2006). The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* **7**, 168-81.
- Restituto, S., Couve, A., Bawagan, H., Jourdain, S., Pangalos, M. N., Calver, A. R., Freeman, K. B. and Moss, S. J.** (2005). Multiple motifs regulate the trafficking of GABA(B) receptors at distinct checkpoints within the secretory pathway. *Mol Cell Neurosci* **28**, 747-56.
- Ribalet, B., John, S. A., Xie, L. H. and Weiss, J. N.** (2006). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: regulation of bursting by the sulphonylurea receptor, PIP2 and regions of Kir6.2. *J Physiol* **571**, 303-17.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. and Yaffe, M. B.** (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* **4**, 153-66.
- Rivera, J. F., Ahmad, S., Quick, M. W., Liman, E. R. and Arnold, D. B.** (2003). An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K<sup>+</sup> channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci* **6**, 243-50.
- Roberts, R. L., Mosch, H. U. and Fink, G. R.** (1997). 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**, 1055-65.
- Rothman, J. E. and Wieland, F. T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-34.
- Rubinson, D. A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, S., Yang, L., Kopinja, J., Zhang, M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L. and Parijs, L. V.** (2003) *Nat Genet* **33**, 401-406
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sandy, P., Ventura, A. and Jacks, T.** (2005). Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques* **39**, 215-24.
- Sato, Y. and Henquin, J. C.** (1998). The K<sup>+</sup>-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes* **47**, 1713-21.
- Schutze, M. P., Peterson, P. A. and Jackson, M. R.** (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **13**, 1696-705.

- Schwappach, B., Zerangue, N., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2000). Molecular basis for K(ATP) assembly: transmembrane interactions mediate association of a K<sup>+</sup> channel with an ABC transporter. *Neuron* **26**, 155-67.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C. and Ehlers, M. D.** (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* **21**, 3063-72.
- Scott, D. B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D. and Ehlers, M. D.** (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J Neurosci* **24**, 7096-109.
- Seino, S. and Miki, T.** (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 133-76.
- Sengelov, H.** (1995). Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol* **15**, 107-31.
- Sharma, N., Crane, A., Clement, J. P. t., Gonzalez, G., Babenko, A. P., Bryan, J. and Aguilar-Bryan, L.** (1999). The C terminus of SUR1 is required for trafficking of KATP channels. *J Biol Chem* **274**, 20628-32.
- Sharma, N., Crane, A., Gonzalez, G., Bryan, J. and Aguilar-Bryan, L.** (2000). Familial hyperinsulinism and pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels. *Kidney Int* **57**, 803-8.
- Shepard, A. R., Jacobson, N. and Clark, A. F.** (2005). Importance of quantitative PCR primer location for short interfering RNA efficacy determination. *Anal Biochem* **344**, 287-8.
- Shi, N. Q., Ye, B. and Makielski, J. C.** (2005). Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 51-60.
- Shibasaki, T., Sunaga, Y., Fujimoto, K., Kashima, Y. and Seino, S.** (2004). Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca<sup>2+</sup> sensor, and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in insulin granule exocytosis. *J Biol Chem* **279**, 7956-61.
- Shikano, S., Coblitz, B., Sun, H. and Li, M.** (2005). Genetic isolation of transport signals directing cell surface expression. *Nat Cell Biol* **7**, 985-92.
- Shikano, S., Coblitz, B., Wu, M. and Li, M.** (2006). 14-3-3 proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins. *Trends Cell Biol* **16**, 370-5.
- Shyng, S. and Nichols, C. G.** (1997). Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J Gen Physiol* **110**, 655-64.
- Stockklauser, C. and Klocker, N.** (2003). Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J Biol Chem* **278**, 17000-5.

- Taschenberger, G., Mougey, A., Shen, S., Lester, L. B., LaFranchi, S. and Shyng, S. L.** (2002). Identification of a familial hyperinsulinism-causing mutation in the sulfonylurea receptor 1 that prevents normal trafficking and function of KATP channels. *J Biol Chem* **277**, 17139-46.
- Telemenakis, I., Benseler, F., Stenius, K., Sudhof, T. C. and Brose, N.** (1997). Rat homologues of yeast *sec7p*. *Eur J Cell Biol* **74**, 143-9.
- Terasaki, M., Chen, L. B. and Fujiwara, K.** (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* **103**, 1557-68.
- Tikkanen, R., Obermuller, S., Denzer, K., Pungitore, R., Geuze, H. J., von Figura, K. and Honing, S.** (2000). The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic* **1**, 631-40.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S. and Ashcroft, F. M.** (1997). Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179-83.
- Tzivion, G. and Avruch, J.** (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **277**, 3061-4.
- van Hemert, M. J., Steensma, H. Y. and van Heusden, G. P.** (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**, 936-46.
- van Zeijl, M. J., Testerink, C., Kijne, J. W. and Wang, M.** (2000). Subcellular differences in post-translational modification of barley 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* **473**, 292-6.
- Varadi, A., Ainscow, E. K., Allan, V. J. and Rutter, G. A.** (2002). Molecular mechanisms involved in secretory vesicle recruitment to the plasma membrane in beta-cells. *Biochem Soc Trans* **30**, 328-32.
- Varadi, A., Grant, A., McCormack, M., Nicolson, T., Magistri, M., Mitchell, K. J., Halestrap, A. P., Yuan, H., Schwappach, B. and Rutter, G. A.** (2006). Intracellular ATP-sensitive K<sup>(+)</sup> channels in mouse pancreatic beta cells: against a role in organelle cation homeostasis. *Diabetologia* **49**, 1567-77.
- Vedrenne, C. and Hauri, H. P.** (2006). Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic* **7**, 639-46.
- Vivithanaporn, P., Yan, S. and Swanson, G. T.** (2006). Intracellular trafficking of KA2 kainate receptors mediated by interactions with coatamer protein complex I (COPI) and 14-3-3 chaperone systems. *J Biol Chem* **281**, 15475-84.

- Voeltz, G. K., Rolls, M. M. and Rapoport, T. A.** (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **3**, 944-50.
- Wang, B., Yang, H., Liu, Y. C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E. and Fu, H.** (1999). Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry* **38**, 12499-504.
- Wang, W. K., Chen, M. Y., Chuang, C. Y., Jeang, K. T. and Huang, L. M.** (2000). Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect* **33**, 131-40.
- Waterman-Storer, C. M. and Salmon, E. D.** (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol* **8**, 798-806.
- Wiznerowicz, M. and Trono, D.** (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77**, 8957-61.
- Wurtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A. and Oecking, C.** (2003). Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *Embo J* **22**, 987-94.
- Yaffe, M. B.** (2002). How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* **513**, 53-7.
- Yuan, H., Michelsen, K. and Schwappach, B.** (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* **13**, 638-46.
- Zeng, Y., Wagner, E. J. and Cullen, B. R.** (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* **9**, 1327-33.
- Zerangue, N., Malan, M. J., Fried, S. R., Dazin, P. F., Jan, Y. N., Jan, L. Y. and Schwappach, B.** (2001). Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2431-6.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**, 537-48.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. and MacKinnon, R.** (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-8.