

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin I**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor**

**Charakterisierung der Interaktion von DRA (down  
regulated in adenoma) mit E3KARP und NHERF**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Andreas Heil  
aus Weingarten**

**2005**

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Gregor
2. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Sessler
3. Berichterstatter:	Professor Dr. W. F. Caspary



---

**INHALT**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Die Resorption von Natrium und Chlorid im Darm .....	2
1.2	Die kongenitale Chlorid Diarrhoe .....	3
1.3	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher und Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Austauscher am Darm .....	5
1.4	DRA – Ein Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Austauscher aus der SLC26 Familie.....	6
1.5	Regulation der apikalen NaCl-Resorption .....	9
1.6	PDZ-Domänen – Struktur und Peptiderkennung.....	12
1.7	Die Funktion von E3KARP und NHERF.....	14
1.8	Fragestellung .....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1	Allgemeines .....	18
2.2	Klonierung und Expression rekombinanter Proteine .....	18
2.2.1	PCR .....	19
2.2.2	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	21
2.2.3	Reinigung von DNA aus Low Melt Agarosegelen .....	23
2.2.3.1	Wizard PCR Preps DNA Purification System.....	23
2.2.3.2	GeneClean II Kit.....	24
2.2.4	Klonierung der PCR-Produkte und Subklonierung des Inserts in den Expressionsvektor.....	26
2.2.4.1	Verwendete Plasmide .....	26
2.2.4.2	DNA-Ligation mit dem Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit.....	29
2.2.4.3	DNA-Ligation mit dem Rapid „DNA Ligation Kit“ .....	29
2.2.5	Transformation von E. coli .....	30
2.2.5.1	Verwendete Bakterienstämme .....	30
2.2.5.2	Herstellung von Medien für die Bakterienkultur.....	31
2.2.5.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation.....	33
2.2.5.4	Transformation von E. coli TOP10 One Shot Cells .....	34
2.2.5.5	Transformation von E. coli NM 522 und BL 21-DE3.....	35

2.2.6	Anlegen von Glycerinkulturen .....	36
2.2.7	Plasmidpräparation .....	36
2.2.7.1	DNA Mini-Präparation zur Charakterisierung der Transformanten.....	37
2.2.7.2	Midi-Präparation zur Plasmidgewinnung.....	38
2.2.8	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	41
2.2.9	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen...	42
2.2.10	Expression und Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen.....	43
2.2.11	Expression von in vivo biotinylierten Proteinen im pinPoint-System ..	45
2.2.12	Synthetisch hergestellte Peptide .....	46
<b>2.3</b>	<b>Analyse von Proteinen .....</b>	<b>47</b>
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry .....	47
2.3.2	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	48
2.3.3	Coomassie-Färbung des Proteingels .....	52
2.3.4	Western Blot .....	52
2.3.5	In vitro Pull Down Assay .....	54
2.3.5.1	Immobilisation und Präzipitation.....	55
2.3.5.2	Nachweis mit Streptavidin-HRP .....	56
2.3.5.3	Nachweis mit anti-DRA Antikörper .....	57
2.3.5.4	Detektion des Signals mit dem ECL-System.....	59
2.3.6	In vitro Pull Down Assay mit Peptiden.....	60
2.3.7	Quantitativer Interaktions-ELISA.....	61
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorarbeiten .....</b>	<b>65</b>
3.1.1	Expression und Aufreinigung der PDZ-Adapterproteine .....	65
3.1.2	Expression der biotinylierten DRA-Konstrukte .....	67
3.1.3	Biotinylierte DRA- und CFTR-Peptide .....	68
3.1.4	Das His-S-Biotin-S-Fusionsprotein.....	69
<b>3.2</b>	<b>Der C-Terminus (ETKF) von DRA ist ein PDZ-Interaktionsmotiv .</b>	<b>70</b>
<b>3.3</b>	<b>Klonierung der „langen“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF .....</b>	<b>73</b>

---

3.4	Der C-Terminus (ETKF) von DRA bindet an die lange 1. PDZ-Domäne .....	76
3.5	DRA-Peptid bindet an NHERF und E3KARP .....	76
3.6	Mutation des unkonventionellen Phenylalanin im ETKF-Motiv von DRA.....	78
3.7	Untersuchung der Bindungsaffinität.....	83
4	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>86</b>
4.1	Methoden zur Testung der Interaktion von Proteinen .....	86
4.2	DRA bindet an E3KARP und NHERF .....	87
4.3	ETKF ist ein spezifisches Interaktionsmotiv .....	89
4.4	Analyse der Bindungsaffinität von DRA an E3KARP und NHERF .....	90
4.5	Physiologische Bedeutung und Schlussfolgerung .....	92
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>95</b>
6	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>96</b>
7	<b>LITERATURVERZEICHNISS</b> .....	<b>98</b>
8	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>108</b>
9	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>109</b>

## ABKÜRZUNGEN

AE	Anionen-Austauscher
AK	Antikörper
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin Triphosphat
BBM	„brush border membrane“
BLM	basolaterale Membran
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	„complementary DNA“
Cl	Chlorid
CLD	Chloride Loosing Diarrhea
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DIDS	4,4'-Diisothiozyanostilben-2',2'-Disulfonsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DRA	„down regulated in adenoma“
dsDNA	„double-stranded DNA“
E	Extinktion
E3KARP	NHE3 Kinase A regulatorisches Protein
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EPI64	EBP50-PDZ Interactor of 64 kD
g	Erdbeschleunigung
GI	Gastrointestinaltrakt
HRP	„horseradish peroxidase“
ID	Identifikationsnummer
IPTG	Isopropyl-β-D-Thio-Galaktopyranosid
Kana	Kanamycin

kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lg	Logarithmus zur Basis 10
MCS	„multiple cloning site“
M	molar
mM	milimolar
MOPS	3- <i>N</i> -Morpholino-propansulfonsäure
mosm	Milliosmol
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher
NHERF	NHE regulierender Faktor
NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PBS	„phosphate buffered saline“
PCI	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol
PCR	„polymerase chain reaction“
PDZ	Adapterprotein, <u>P</u> SD 95, <u>D</u> LG, <u>Z</u> O-1
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	„rotations per minute“
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
SLC	Solute Carrier Family
ssDNA	„single-stranded DNA“
TAE	Tris / „acetic acid“ / EDTA
TBE	Tris / Borat / EDTA
TE	Tris / EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin

TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
u	„unit(s)“
V	Geschwindigkeit
w/v	„weight per volume“
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

## 1 EINLEITUNG

Dem Transport von Wasser und Elektrolyten kommt im Darm eine Schlüsselrolle zu. Die im Darm enthaltene Wassermenge ist von äußerster Wichtigkeit für eine Vielzahl von Prozessen und wird dementsprechend genau reguliert. So muss für Verdauung und Absorption der Darminhalt flüssig genug sein. Des Weiteren dient das Wasser als Medium, wodurch einerseits Enzyme in Kontakt mit dem Speisebrei kommen können, und andererseits die Nährstoffe zu den epithelialen Zellen diffundieren können, wo die Absorption stattfindet.

Die im Darm vorhandene Menge an Flüssigkeit variiert je nach Menge der zugeführten Speisen und Getränke, beträgt aber im Mittel etwa 9 l. Diese bestehen aus ungefähr 2000 ml Nahrung bzw. Getränken, 1500 ml Speichelflüssigkeit, 2500 ml Magensaft, 500 ml Galle, 1500 ml Pankreassaft und 1000 ml vom Darm selbst sezernierter Flüssigkeit. Ein Großteil davon wird in den nachfolgenden Darmabschnitten zusammen mit den verdauten Nahrungsbestandteilen wieder reabsorbiert. Zusätzlich strömt den absorbierten Elektrolyten Flüssigkeit passiv nach. Im Kolon kommen bereits nur noch 1500 - 2000 ml der ursprünglichen Flüssigkeit an (73). Bis auf etwa 100 ml, welche mit dem Stuhl ausgeschieden werden, werden diese dort resorbiert (13).

Neben dieser enormen Absorptionskapazität besteht auch die Fähigkeit zur Sekretion von Wasser und Elektrolyten. Unter normalen Bedingungen werden täglich ca. 1000 ml sezerniert. Toxin- oder hormonvermittelt kann dies aber auf ein Vielfaches ansteigen. Das wohl drastischste Beispiel hierfür ist die Cholera, bei der die pathologisch gesteigerte Sekretion von Flüssigkeit zu 10 - 20 l wässrigem Stuhl führen kann (72).

Dadurch, dass der Darm nicht nur einfach ein „Rohr“ ist, sondern durch Faltung der Schleimhautoberfläche, Villi und Mikrovilli seine Oberfläche auf das

600-fache vergrößert, wird es überhaupt erst möglich derart große Mengen Flüssigkeit zu sezernieren und zu absorbieren.

Bei dem Transport von Wassermolekülen in das und aus dem Darmlumen heraus handelt es sich um einen passiven Prozess. Das Wasser folgt den aktiv transportierten Elektrolyten. Die aktiv transportierten Elektrolyte spielen also eine zentrale Rolle bezüglich der Regulation von Wassersekretion und -absorption.

### **1.1 Die Resorption von Natrium und Chlorid im Darm**

Im gesunden Darm erfolgt die Resorption von Natrium, Chlorid und anderen Elektrolyten entweder passiv entlang eines chemischen und/oder elektrischen Gradienten oder aktiv entgegen diesem Gradienten. In der permeablen Membran des oberen Dünndarms herrscht der sekundär aktive Transport, angetrieben durch die basolateral gelegene  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , vor. Im Gegensatz dazu ist im Ileum und besonders im Kolon, wo die intestinale Mukosa relativ dicht ist, aktiver Transport für den Elektrolytaustausch essentiell (46).

Das distale Ileum und das Kolon sind Hauptort für die elektroneutrale  $\text{NaCl}$ -Absorption im Gastrointestinaltrakt. Der größte Teil dieses Vorganges ist durch gekoppelte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher vermittelt (51,52,58,59,76). Beide Gruppen von Ionentransportproteinen sind für den elektroneutralen, eins zu eins Austausch von entweder Kationen oder Anionen über die Plasmamembran zuständig. Für diese Transportvorgänge ist die Hydrolyse von ATP nicht notwendig, obwohl die Höhe des zellulären Energieniveaus die Austauschrate der Transporter beeinflusst (42).

Knickerbein et al. (51,52) untersuchten bereits 1985 die funktionelle Kopplung des Natrium- und Chloridtransports an Bürstensaummembranen des Kaninchenileums, ohne die molekulare Identität der Ionenaustauscher zu kennen. Sie zeigten, dass es sich weder um direkten  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransport noch

um  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransport handeln kann, sondern viel mehr um zeitgleich auftretenden gekoppelten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch. Es fanden sich Hinweise, dass diese funktionelle Kopplung durch den intrazellulären pH bzw. durch den pH einer gemeinsamen, subapikal gelegenen Mikrodomäne vermittelt wird. Weitergehende Untersuchungen, beispielsweise hinsichtlich einer physischen Interaktion, waren Mangels der molekularen Identität des intestinalen Anionenaustauschers nicht möglich.

## 1.2 Die kongenitale Chlorid Diarrhoe

Obwohl das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Regulation der NaCl-Resorption liegt, soll aufgrund der klinischen Bedeutung und zum besseren Verständnis an dieser Stelle ausführlich auf die kongenitale Chloriddiarrhoe eingegangen werden.

Bereits 1945 wurden von Darrow (12) und Gamble et al. (23) zwei Patienten beschrieben, die an wässriger Diarrhoe mit hohem Chloridgehalt im Stuhl und metabolischer Alkalose litten. Die Erkrankung wurde als *Metabolische Alkalose mit Diarrhoe* bezeichnet. Erst als die Grundlagenforschung es ermöglichte, die Pathologie des Chloridtransports zu verstehen, wurde die Erkrankung in *Kongenitale Chlorid Diarrhoe (CLD = Chloride Loosing Diarrhea)* umbenannt (71). Bis heute wurde über 250 Fälle, sowohl bei Kindern, als auch bei Erwachsenen berichtet. Die Erkrankung ist in Teilen Finnlands, in Polen und in den Anrainerstaaten des persischen Golfs endemisch (65). Die Inzidenz variiert von 1 : 200000 in Polen über 1 : 20000 in Finnland bis hin zu der höchsten Inzidenz in den Golfstaaten mit 1 : 5000 (bezogen auf Lebendgeburten) (46). Bei der außergewöhnlich hohen Inzidenz der Arabischen Völker ist zu bedenken, dass diese eventuell durch die Heirat von Blutsverwandten zustande kommen kann (31). Die ebenfalls recht hohe Inzidenz in Finnland, die in Hoch-Risiko-Gebieten auf bis zu 1: 10000 ansteigen kann, erklärt sich einerseits durch „genetischen drift“ und andererseits durch zwei aufeinanderfolgende Völkerwanderungen, welche zu einem sogenannten „founder effect“ führten.

Diese Zahlen können jedoch nicht als allgemeingültig betrachtet werden, da  $\frac{1}{4}$  aller Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren auf akuten Durchfall zurückzuführen sind, und auch die meisten CLD-Patienten an akutem Durchfall versterben und sich nicht mit protrahierter Symptomatik präsentieren.

In Untersuchungen, die in den 70er Jahren durchgeführt wurden, ergaben sich Hinweise darauf, dass die CLD aus einem Verlust des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches im Kolon herrührt. Durch Perfusionsstudien konnte der Defekt im  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch von Ileum und Kolon lokalisiert werden, welcher normalerweise für die Reabsorption von Chlorid in die Epithelzelle und die Exkretion von  $\text{HCO}_3^-$  in das intestinale Lumen zuständig ist (38). Da der Austausch von  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  mit dem von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  gekoppelt ist (92), ist bei der CLD die Reabsorption von Chlorid und in gewissem Maße auch die von Natrium gestört. Dem Verlust von Elektrolyten in den sauren Stuhl folgt durch osmotische Vorgänge Wasser. Dies resultiert in voluminöser wässriger Diarrhoe (36,38). Die Diarrhoe beginnt bereits in utero, führt zu einem Polyhydramnion und erweiterten flüssigkeitsgefüllten Darmschlingen. Dies ist vor Geburt mittels Ultraschall feststellbar (50). Die Symptomatik, die durch den raschen Entzug von extrazellulärer Flüssigkeit bedingt ist, beginnt in der neonatalen Periode mit Hyponaträmie, Hypochloridämie, Hyperbilirubinämie und wird später begleitet von metabolischer Alkalose, Hypokaliämie und sekundärem Hyperaldosteronismus. Die Dehydration kann rasch zu Tod führen. Patienten, die wegen eines weniger aggressiven Verlaufs der Erkrankung undiagnostiziert bleiben und die ersten kritischen Monate überleben, fallen durch Wachstumsretardierung und Niereninsuffizienz auf (37). Die Bestätigung der Diagnose erfolgt durch Bestimmung der Chloridkonzentration im Stuhl, die grundsätzlich 90 mmol/l übersteigt, sofern es sich um Patienten mit korrigiertem Wasser- und Elektrolythaushalt handelt. Die Therapie, die lebenslang notwendig ist, erfolgt durch Substitution von NaCl, KCl und Wasser, beim Neugeborenen intravenös und später oral (35). Durch konsequent durchgeführte Therapie werden normales Wachstum und normale Entwicklung erreicht, ebenso kommt es zur Verbesserung der Serumelektrolytwerte. Die Diarrhoe selbst aber bleibt von der Therapie unbeeinflusst. Zur

medikamentösen Therapie steht zur Zeit nur Omeprazol zur Verfügung (1), welches die Chloridsekretion der Parietalzellen im Magen verringert, wodurch weniger Chlorid in die Teile des Darms mit beeinträchtiger Chloridreabsorption gelangt.

### **1.3 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher am Darm**

Vor dem Hintergrund der Daten von Knickelbein stellt sich die Frage, welche Proteine an der apikalen elektroneutralen NaCl-Resorption beteiligt sind.

Für den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch kommen die aus der SLC9-Genfamilie stammenden Isoformen NHE1-3 in Betracht. Es werden aber nur zwei dieser Isoformen, NHE2 und NHE3, in den apikalen Membranen der Epithelzellen von Dünndarm und Kolon exprimiert (39). Schultheis et al. zeigten, dass nur NHE3-, aber nicht NHE2-Knockout Mäuse an Diarrhoe erkranken (81). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der NHE3 bezüglich der NaCl-Absorption durch gekoppelten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch eine Hauptrolle spielt.

Die molekulare Identität des an der NaCl Absorption beteiligten Anionenaustauscher war lange Zeit ungeklärt. Die am  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch beteiligten Transporter werden durch zwei Genfamilien kodiert.

Von den Anionenaustauschern AE1, AE2 und AE3 aus der SLC4-Genfamilie kommt nur der AE2 in Frage, da nur dieser im Intestinaltrakt exprimiert wird und initial auch durch Western-Blot-Analyse in Bürstensaummembranen des Ileums nachgewiesen wurde (11). Diese Daten haben sich in einer Untersuchung von Alper et al (2) jedoch nicht bestätigt. Es wurde gezeigt, dass der AE2 basolateral lokalisiert ist. Auch das schwerwiegende Defizit des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches bei Patienten, die an kongenitaler Chlorid Diarrhoe (siehe 1.2) erkrankt sind, weist indirekt daraufhin, dass es sich bei dem AE2 nicht um den wesentlichen apikalen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in Ileum und Kolon handelt.

Die zehn SLC26 Anionenaustauscher gehören zu einer erst kürzlich charakterisierten Genfamilie. Unter anderem ist hier auch das für das Pendred Syndrom und Taubheit verantwortliche Gen Pendrin (SLC26A4) enthalten. Der SLC26A3 wird aufgrund des besonderen Interesse ausführlich im folgenden Kapitel besprochen.

#### **1.4 DRA – Ein Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher aus der SLC26 Familie**

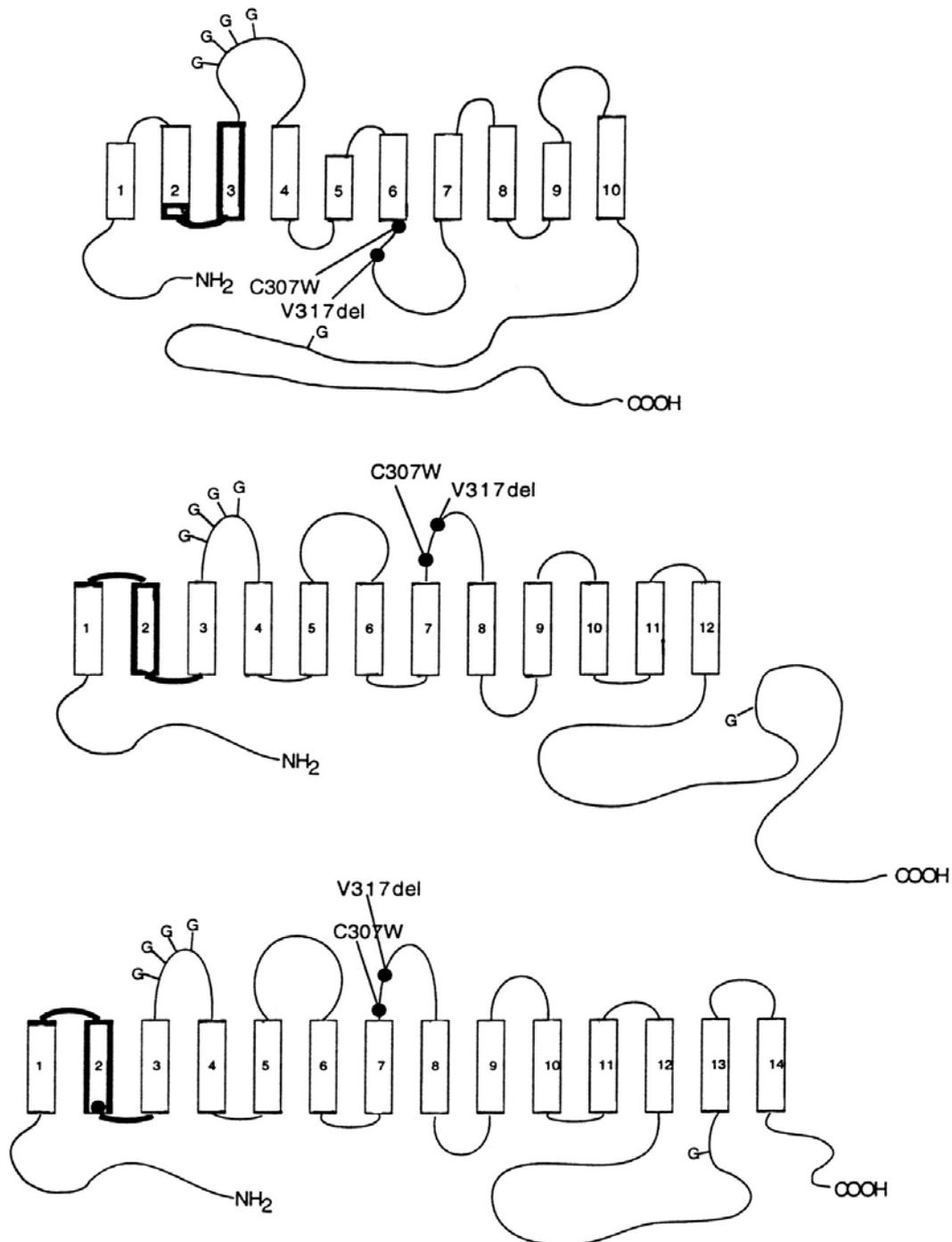
Funktionelle Studien haben bereits gezeigt, dass der durch die CLD bedingte Defekt zu einem nicht ausreichendem Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austausch im distalen Ileum und Kolon führt. Die zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen waren bis zur Identifikation des bei der CLD mutierten Gens allerdings unklar (46). Kere et al. untersuchten drei für die CLD in Frage kommende Gene (47). Sie fanden, dass das Zielgen auf dem Chromosom 7q31 nahe dem Gen für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ gelegen ist.

1993 identifizierten Schweinfest et al. ein Gen aus der Mukosa des menschlichen Kolons, dessen Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in Kolon-Adenomen und Adenokarzinomen signifikant herunterreguliert ist. Sie nannten es deshalb DRA – *down-regulated in adenoma* (83). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte später an mit DRA transfizierten COS-1 Zellen mittels Immunfluoreszenz dessen Lokalisation in der Zellmembran, bzw. während seiner Entstehung im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat.

In der Analyse der Zellen mittels Westernblot zeigte sich eine diffuse Bande bei ungefähr 95 kD und eine Doppelbande bei 75 kD. Nach Behandlung mit Glykosidase verschwindet die diffuse Bande und die Doppelbande läuft weiter nach unten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich um ein Membran-Glykoprotein handelt (9).

Computerunterstützten Vorhersagen zufolge handelt es sich um ein aus 10, 12 oder 14 transmembranären Segmenten bestehendes Membranprotein (9). Das

vorhergesagte DRA-Protein ist am N-terminalen Ende mehrfach glykosyliert, zeigt aber keine erkennbaren ATP-bindenden Domänen (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Computergestützte Vorhersage der Sekundärstruktur von DRA.** Eingezeichnet sind die Mutationen V317del, C307W und mögliche Glykosylierungsstellen (G) (65).

Höglund et al. deckten zwischenzeitlich die Lokalisation des DRA-Gens auf. Es liegt auf dem Chromosom 7q31, also an derselben Position, an der auch der Gendefekt für die Kongenitale Chlorid Diarrhoe liegt (33). Diese Arbeitsgruppe stellte dann auch die Verbindung zwischen DRA und der Kongenitalen Chlorid Diarrhoe her, indem sie zeigten, dass die Erkrankung durch eine Mutationen des DRA-Gens hervorgerufen wird (32,34).

Das DRA Protein wird physiologischerweise in der apikalen Membran von an der Oberfläche gelegenen Enterozyten des proximalen Kolon (9), des Duodenum (40) und im Ileum (9) exprimiert. Des Weiteren wird es auch in Samenbläschen, in Schweißdrüsen (26), sowie Gewebekulturen des Pankreasgang (25) und der Trachea (98) exprimiert.

Mit den Transporteigenschaften von DRA beschäftigte sich 1994 als erstes die Arbeitsgruppe um Silberberg. Eine computergestützte Analyse der Nuklein- und Aminosäuresequenz von DRA zeigte hohe Homologie mit der Sulfatpermease II (Cys-14) des roten Brotschimmels (*Neurospora crassa*) und des Sulfat-Anionen-Transporters (Sat-1) von Rattenhepatozyten. An Oozyten des *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) wurde gezeigt, dass es sich bei DRA um einen darmspezifischen DIDS-sensitiven Sulfat- und Oxalat-Transporter handelt (87). Diese Ergebnisse wurde vier Jahre später von Byeon et al. an mit DRA transfizierten Sf9 Zellen (eine Ovarialzelllinie des Asiatischen Baumwollwurms) bestätigt (8). Moseley et al. untersuchten als erste den Chloridtransport von DRA. Sie zeigten, dass DRA zusätzlich zu Sulfat auch DIDS-sensitiven Chloridtransport vermittelt, wobei die Anwesenheit von Chlorid den Sulfattransport hemmt. Transfektion von Oozyten mit DRA, das die häufig bei finnischen CLD-Patienten vorkommenden Mutationen V317del aufweist, führte zu signifikant vermindertem Chloridtransport. Dies gilt nicht für die C307W Mutation, welche ein funktionell unbedeutsamer Polymorphismus zu sein scheint (65). Noch im selben Jahr wurde demonstriert, dass DRA auch  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt und natriumunabhängig arbeitet (63).

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von DRA und den AE-Isoformen ergab, dass DRA und die AE-Isoformen verschiedenen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscherfamilien angehören. Untersuchungen an NHE3 defizienten Mäusen ergaben, dass neben der massiven Hochregulation der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase und des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal des Kolons (81) die mRNA Expression von DRA im proximalen Kolon um ca. 75 % und im distalen Kolon um ca. 50 % erhöht ist (63).

Betrachtet man all diese Ergebnisse zusammen, kommt man zu dem Schluss, dass es sich bei DRA um den apikalen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher im Gastrointestinaltrakt handelt. Zusammen mit dem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher NHE3 ist er für die elektroneutrale Resorption von NaCl im distalen Ileum und im Kolon verantwortlich.

### 1.5 Regulation der apikalen NaCl-Resorption

Grundsätzlich lassen sich bezüglich der Regulation des epithelialen Transports im Magen-Darm-Trakt vier Hauptmechanismen identifizieren (64):

1. *Transkription und Translation des entsprechenden Gens*, wobei natürlich zu beachten ist, dass dieser Mechanismus, da er auf Ebene der de novo Proteinsynthese stattfindet, eine deutlich langsamere Kinetik aufweist als die folgenden Schritte.
2. *Direkte Einwirkung zellulärer Faktoren*, wie zum Beispiel der Einfluss der intrazellulären Protonenkonzentration auf die NHE-Familie (57).
3. *Kovalente Modifikation von Transportproteinen*, beispielsweise die Phosphorylierung und dadurch die Inhibition von NHE3 durch PKA (55,104).
4. *Anzahl der Transporter in der Plasmamembran*: Unmittelbar unter der relevanten Membrandomäne befinden sich Vesikel, die das Transportprotein enthalten und durch entsprechende Stimulation mit der Plasmamembran fusionieren. Hierdurch erhöht sich die Anzahl der Transporter in der Membran und auch Ihre Transport  $V_{\max}$ . Umgekehrt

erfolgt die Drosselung oder Beendigung des Transports häufig durch Endozytose (4,14,60,61).

Da die Identität des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher lange ungeklärt war, konzentrierte sich die Forschung bezüglich der Regulation zunächst auf den NHE3.

Die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher-Isoformen NHE 1,2 und 3 reagieren auf eine Vielzahl von Stimuli, wie zum Beispiel intrazelluläre Azidifizierung, Wachstumsfaktoren, Hormone und Tumorpromotoren. Man geht davon aus, dass all diese Reize letztlich durch die Aktivierung von Proteinkinasen vermittelt werden (3,16). Ursprünglich dachte man, dass deren Aktivierung zur direkten Phosphorylierung des Transporters führt, jedoch lassen neuere Studien an dieser Hypothese zweifeln. Für den NHE1 beispielsweise wurde bewiesen, dass die Regulation durch Proteinkinasen nicht immer mit dem Status der Phosphorylierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher korreliert und dass die Phosphorylierung alleine nicht dessen Regulation erklären kann (24,93). Zusätzlich zeigte die Arbeitsgruppe um Wakabayashi, dass trotz Beseitigung aller bedeutenden Phosphorylierungsstellen des intrazellulär gelegenen zytoplasmatischen Schwanzes von NHE1, die Stimulation durch Proteinkinasen nicht völlig unterdrückt wird (93). Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass zumindest in manchen Fällen die Regulation von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschern durch Phosphorylierung akzessorischer Proteine erfolgt.

Basierend auf dieser Hypothese suchten Yun et al. mittels eines „Yeast Two-Hybrid System“ für den NHE3 nach Interaktionspartnern (102). Das so identifizierte Protein E3KARP (NHE3 kinase A regulatory protein) zeigte in hohem Maße Ähnlichkeit mit NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger Regulatory Factor), welches zuvor bereits von Weinman et al. identifiziert wurde und als Co-Faktor für die cAMP-bedingte Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers in der Bürstensaummembran der Niere benötigt wird (96,97). Der Vergleich der Aminosäuren-Sequenz der beiden Proteine lässt erkennen, dass es zwei Regionen gibt, die sich sehr ähnlich sind (Abbildung 1.2).

E3KARP	M---AAPEPLR <b>PRLCRLVRGEQGYGFHLHGKGRRGQFIRRVEPGSPAEA</b> -47
EBP50	MSADAAAGAPL <b>PRLCCLEKGFNGYGFHLHGKGLGQYIRLVEPGSPAEK</b> -50
E3KARP	<b>AALRAGDRLVEVNGVNVVEGETHHQVVQRIKAVEGQTRLLVVDQETDEELR</b> -97
EBP50	<b>AGLLAGDRLVEVNGENVEKETHQQVVSRIRAALNAVRLLVVDPETDEHCR</b> -100
E3KARP	RRQLTCTEEMAQRGLPPAHDWPWEKPDWAHTGSHSSEAGKGDVSGPL--- -144
EBP50	SRR-----PGPRG-----AAARPGTPGQAEPPAAAEVQ -128
E3KARP	----- <b>RELRPRLCHLRKGPQGYGFNLHSDKSRPGQYI</b> -176
EBP50	GAGNENEPREADKSHPEQ <b>RELRPRLCTMKKGPSGYGFNLHSDKSKPGQFI</b> -178
E3KARP	<b>RSVDPGSPAARSGLRAQDRLIEVNGQNVEGLRHAEVVASIKAREDEARLI</b> -226
EBP50	<b>RSVDPDSPAEASGLRAQDRIVEVNGVCMEGKQHGDDVVS AIRAGGDETLL</b> -228
E3KARP	<b>VVDPETDEHFKRLRVTPTTEHVEGPLPSPVTNGT</b> ----- -260
EBP50	<b>VVDRETDEFFKCRVIPSQEHLNGPLVPFTNGEIQKENSREALAEAALE</b> -278
E3KARP	-----SPAQLNGGSACSSRSDLPGSDKDTEEDGS -288
EBP50	SPRPALVRSASSDTSEELNSQDSPPKQDSTAPSSSTSSS----- -316
E3KARP	AWKQDPFQESGLHLSPTAAEAKEKARAMRVNKRAPQMDWNRKREIFSNF -337
EBP50	----DPILDFNISLAM----AKERAHQKRSSKRAPQMDWSKKNELFSNL -357

**Abbildung 1.2: Vergleich der Aminosäuresequenz von E3KARP und NHERF.**  
Identische Aminosäuren sind mit | gekennzeichnet. Die schattierten Bereiche entsprechen der 1. und 2. PDZ-Domäne (102,103).

Interessanterweise zeigen diese Regionen signifikante Ähnlichkeit (48-53%) mit einem Motiv, das als PDZ (PSD 95, DLG, ZO-1, ausführlich dazu unten) Sequenz Motiv bekannt ist (74). Die PDZ-Domäne I (Aminosäuren 1-96) und PDZ-Domäne II (Aminosäuren 151-237) weisen über 70 % Identität auf, sowohl untereinander, als auch zwischen den beiden Proteinen. In den letzten Jahren wurden die PDZ-Domänen als Module für spezifische Protein-Protein Bindung charakterisiert. Solche Module sind wahrscheinlich nicht nur für das „Clustering“ von Membranproteinen wichtig, sondern auch für die Bindung von Signalmolekülen an einen Proteinkomplex an besonderen Stellen der Zellmembran (48,53).

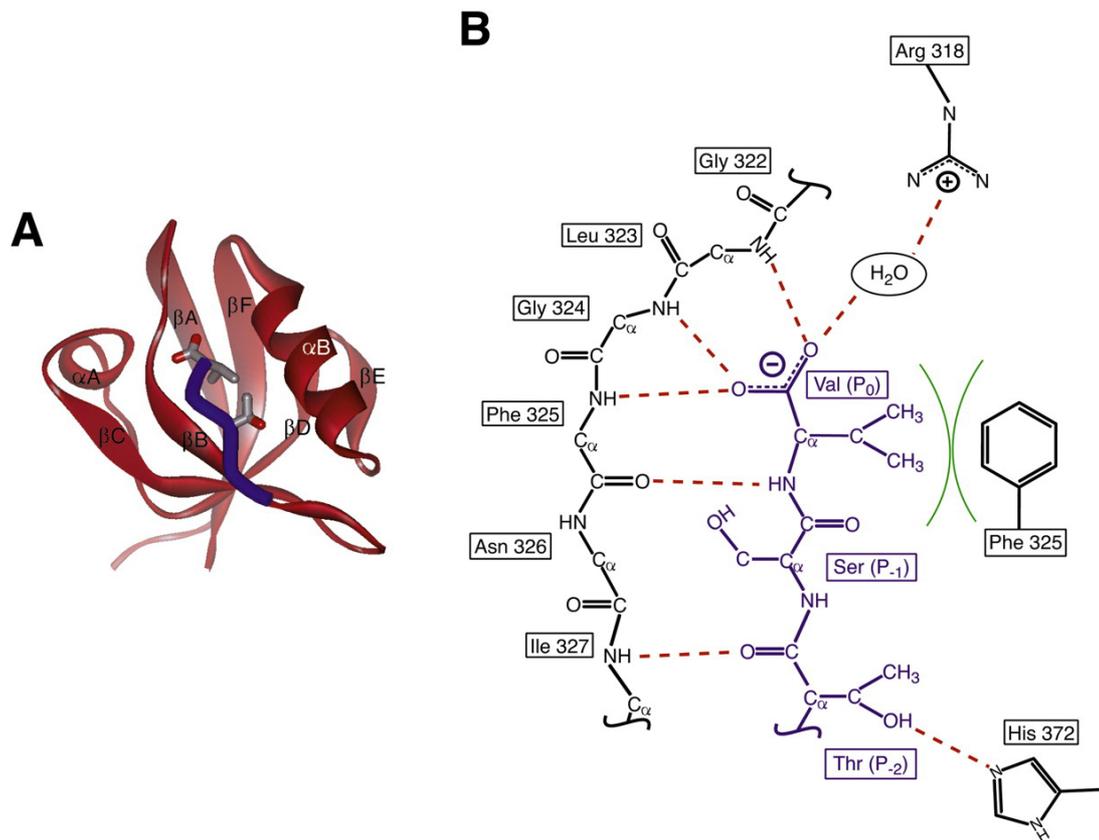
Bevor die Interaktion von NHE3 mit E3KARP und NHERF näher erklärt wird, soll zum besseren Verständnis im nächsten Kapitel zunächst allgemein auf die PDZ-Domänen eingegangen werden.

### **1.6 PDZ-Domänen – Struktur und Peptiderkennung**

PDZ-Domänen wurden zunächst in diversen Signalproteinen als Sequenzbereiche mit hoher Homologie identifiziert (10,49,99). Der Name PDZ stammt von den ersten drei Proteinen, in welchen diese Domäne beschrieben wurde: PSD-95 (post synaptic density, ein 95 kDa schweres Protein, welches in der Signalübertragung der post-synaptischen Dichte vorkommt), DLG (das *Drosophila melanogaster* Discs Large Protein) und ZO-1 (das Zonula occludens 1 Protein, das an der Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität beteiligt ist).

PDZ-Domänen funktionieren als Protein-Protein-Interaktionsmodule. Die als erste identifizierte und bei weitem auch häufigst vorkommende Funktion der PDZ-Domänen ist das Erkennen spezifischer C-terminaler Motive ihrer Partnerproteine. Hierbei handelt es sich oft um das zytoplasmatische Ende von transmembranären Transport- und Rezeptorproteinen (53,69).

Die Struktur von PDZ-Domänen wurde mittels Kristallographie sowie durch Magnetresonanztomographie untersucht (17,43,44). Wie viele andere Protein-Protein-Interaktionsmodule auch sind PDZ-Domänen relativ kurz (ungefähr 90 Aminosäuren), kompakt und kugelförmig gefaltet. Ihre N- und C- Termini sind im gefalteten Zustand nahe beieinander gelegen. Dadurch sind diese Domänen hochmodular und konnten so im Lauf der Evolution in bereits bestehende Proteine integriert werden. Die so gefaltete PDZ-Domäne besteht aus sechs  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ A- $\beta$ F) und zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A und  $\alpha$ B). (Abbildung 1.3 A)



**Abbildung 1.3: Struktur einer PDZ-Domäne, Mechanismen der Peptiderkennung.**  
 (A) Grafik der 3. PDZ-Domäne von PSD-95 (rot) mit einem gebundenen Peptid (blau)  
 (B) Schematische Darstellung der Peptidbindung: Aminosäuren der PDZ-Domäne sind schwarz, die des Peptids lila dargestellt. Die rotgestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar (29).

Die Peptidliganden binden durch einen Mechanismus, der  $\beta$ -Strang-Addition genannt wird, in eine erweiterte Fuge zwischen  $\beta B$ -Strang und  $\alpha B$ -Helix (30). Genauer gesagt dient das Peptid als zusätzlicher  $\beta$ -Strang, der sich dem bereits bestehenden  $\beta B$ -Strang der PDZ-Domäne anlagert. Zwischen diesen „beiden“  $\beta$ -Strängen kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Durch die Ligandenbindung erfolgt aber keine Strukturveränderungen der PDZ-Domäne (17). (Abbildung 1.3 B)

PDZ-Domänen erkennen spezifisch C-terminale Sequenzmotive, die für gewöhnlich ungefähr vier Aminosäuren lang sind. Die Nomenklatur für Aminosäuren innerhalb dieses Motivs erklärt sich wie folgt: Die C-terminale

Aminosäure wird als  $P_0$  bezeichnet, die Aminosäuren weiter zum N-terminalen Ende hin werden mit  $P_{-1}$ ,  $P_{-2}$ ,  $P_{-3}$  usw. bezeichnet. Die ersten Ergebnisse bezüglich der Spezifität von PDZ-Domänen wurden durch ausführliche Rasteruntersuchungen von Peptidbibliotheken erschlossen (82,88). Diese Studien ergaben, dass die Aminosäuren an den Positionen  $P_0$  und  $P_{-2}$  für die Erkennung am wichtigsten sind. Es stellte sich heraus, dass die PDZ-Domänen bezüglich des Erkennungsmotivs der C-terminalen Residuen, abgesehen von einigen Ausnahmen, in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können (29):

- PDZ-Domänen der Klasse I erkennen das Motiv S/T-X- $\Phi$  -COOH
- PDZ-Domänen der Klasse II erkennen das Motiv  $\Phi$ -X- $\Phi$  -COOH
- PDZ-Domänen der Klasse III erkennen das Motiv X-X-C -COOH

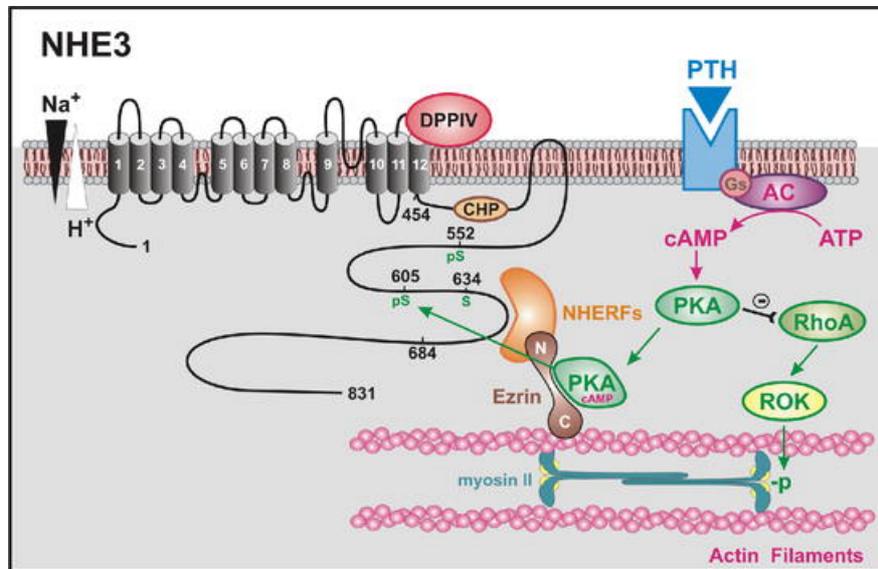
(Wobei X für eine beliebige und  $\Phi$  für eine hydrophobe Aminosäure, in der Regel Valin, Leucin oder Isoleucin, steht.)

### 1.7 Die Funktion von E3KARP und NHERF

Wie oben bereits erwähnt, inhibiert cAMP die transepitheliale  $\text{Na}^+$ -Absorption durch NHE3 (15,95,96). Die Notwendigkeit eines zusätzlichen Regulatorfaktors wurde an PS120 Zellen demonstriert, welche weder E3KARP noch NHERF exprimieren und in denen infolgedessen die NHE3 Aktivität von cAMP nicht beeinflusst wird. Durch Transfektion von entweder E3KARP oder NHERF konnte die cAMP abhängige NHE3 Inhibition hergestellt werden (102).

Lamprecht et al. bewiesen, dass die Regulation von NHE3 nicht durch Phosphorylierung von E3KARP und NHERF erfolgt (55). Für beide Proteine wurde gezeigt, dass sie keine AKAPs (A kinase anchoring proteins) sind (20). Sowohl für E3KARP (101), als auch NHERF (77) wurde gezeigt, dass sie an Ezrin binden. Dransfield und Mitarbeiter zeigten, dass Ezrin direkt die Protein Kinase A bindet, also ein AKAP ist (18). Bezüglich der eigentlichen Bindung von NHE3 an E3KARP und NHERF wurde vor allem von der Arbeitsgruppe um Mark Donowitz interessante Ergebnisse erzielt. Es wurde bewiesen, dass sowohl E3KARP (101) als auch NHERF (95) an NHE3 binden. Für die zweite

PDZ-Domäne von E3KARP wurde gezeigt, dass für die Bindung zusätzlich dessen C-terminales Ende benötigt wird.



**Abbildung 1.4: Organisation und Regulation des NHE3.**

Die Rezeptoraktivierung durch Parathormon (PTH) führt letztlich zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese phosphoryliert den N<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher NHE3 und inhibiert diesen dadurch (70).

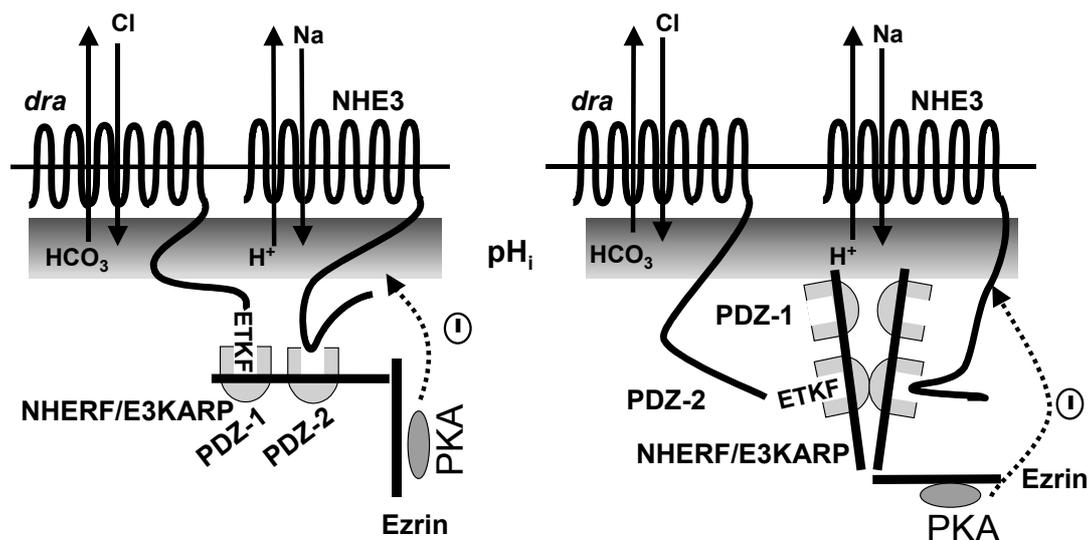
Fasst man all diese Erkenntnisse zusammen lässt sich folgendes Model etablieren: Die Adapterproteine NHERF und E3KARP koppeln NHE3 an Ezrin. Einerseits wird so die Struktur der Mikrovilli unterstützt und andererseits wird durch das als AKAP funktionierende Ezrin die Protein Kinase A in unmittelbare Nähe von NHE3 gebracht. Durch cAMP bedingte Stimulation der Protein Kinase A dissoziiert deren katalytische Untereinheit von der regulatorischen ab und phosphoryliert NHE3. Dies führt durch Veränderung der pH-Abhängigkeit zur Inhibition des Transporters (55). (Abbildung 1.4)

## 1.8 Fragestellung

Die vier C-terminalen Aminosäuren von DRA sind ETKF (Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin). Diese Aminosäuresequenz ähnelt einem Interaktionsmotiv für PDZ-Domänen. Durch Bindung von E3KARP bzw. NHERF an DRA

könnte neben der schon früher entdeckten funktionellen Kopplung von NHE3 und DRA für die elektroneutrale NaCl-Resorption auch eine strukturelle Kopplung entstehen. (Abbildung 1.5)

Abhängig davon, an welche der beiden PDZ-Domänen DRA bindet, sind zwei Modelle einer strukturellen Kopplung von NHE3 und DRA über die PDZ-Adapterproteine vorstellbar. Sollte DRA über die 1. PDZ-Domäne an die Adapterproteine binden, könnten beide Transporter gemeinsam an E3KARP bzw. NHERF binden. Für den Fall, dass DRA, wie auch NHE3, an die 2. PDZ-Domäne der Adapterproteine bindet, ist eine mehr indirekte Kopplung der Transporter durch Dimerisierung der 2. PDZ-Domäne (56,85) vorstellbar.



**Abbildung 1.5: Schema zur strukturellen Kopplung von DRA und NHE3.**  
 Binden die Transporter an verschiedene PDZ-Domänen eines Adapterproteins (links)? Oder binden sie an die gleiche PDZ-Domäne zweier Adapterproteine, und die Kopplung erfolgt mehr indirekt, z.B. über Dimerisierung der 2. PDZ-Domäne der Adapterproteine (rechts)?

**Ziel dieser Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:**

1. Bindet DRA an E3KARP und NHERF, und wenn ja, bindet es an deren 1. oder 2. PDZ-Domäne?
2. Handelt es sich bei ETKF, aufgrund des für ein PDZ-Interaktionsmotiv ungewöhnlichen Phenylalanin in Position P<sub>0</sub>, tatsächlich um ein spezifisches Interaktionsmotiv?
3. Mit welcher Affinität erfolgt die Bindung?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Alle Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse, ACS“ oder, wenn erhältlich, den Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“.

Der Begriff „ddH<sub>2</sub>O“ wird im Folgenden für bidestilliertes Wasser verwendet, das über eine Milli-Q-Plus Filteranlage (Millipore, Billerica, USA) gereinigt wurde.

Als „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert (H+P Varioklav, Oberschleißheim, Deutschland).

Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore) filtriert.

### 2.2 Klonierung und Expression rekombinanter Proteine

Die in einer PCR-Reaktion hergestellte DNA wird in den pCR-Blunt II-TOPO Vektor ligiert und damit E. coli TOP10 Zellen transformiert. Nach Überprüfung der Transformanten durch DNA-Mini Präparation und Restriktionsverdau wird die DNA der Klone, die das Insert in der richtigen Orientierung enthalten, aus dem Agarose Gel aufgereinigt und in das pET 30 Vektor System subkloniert. Mit diesem Plasmid werden E. coli NM 522 Zellen transformiert. Dieser Zwischenschritt ist zur Plasmidvervielfältigung nötig. Auch diese Klone werden auf das Insert getestet. Mit den dabei aufgereinigten Plasmiden werden schließlich die E. coli BL 21 (DE3) Zellen transformiert, in denen die Proteine durch Induktion mit IPTG exprimiert werden.

### 2.2.1 PCR

Aufgrund des exponentiellen Charakters der PCR müssen selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes findet räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wird, wobei jeweils auch ein hierfür reservierter Pipetten-Satz verwendet wird. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien werden in Aliquots gelagert. Steriles, bidestilliertes Wasser wird literweise verpackt bezogen (Ampuwa, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland). Vermutlich mit PCR-Produkt verunreinigte Reagenzien werden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände werden mit kurzwelligem UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt.

#### Materialien:

- Native Pfu DNA-Polymerase, 2,5 U/µl (Stratagene, La Jolla, USA)
- Native Plus 10x Pfu Puffer (Stratagene)
- 10 mM dNTP-Mix: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Qiagen, Valencia, USA)
- spezifisches DNA Template 100 ng/µl
- spezifische Primer (Gibco Life Technologies, Maryland, USA)
- 10 µM "forward" Primer
- 10 µM "reverse" Primer
- steriles, bidestilliertes Wasser: Ampuwa (Fresenius)
- Filterpipettenspitzen ( Biozym, Oldendorf, Deutschland)
- dünnwandige 0,2 ml Reagenzgefäße (Biozym)

#### Geräte:

- "Thermo Cycler": GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, Wellesley, USA)

#### Arbeitsanweisung:

Für eine Standard-PCR-Reaktion werden folgende Komponenten in einem auf Eis vorgekühlten dünnwandigen 0,2 ml Reagenzgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

	Reaktion	1. Kontrolle	2. Kontrolle	3. Kontrolle
Ampuwa	38 µl	39 µl	40 µl	40 µl
10x Pfu Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10 mM dNTP – Mix	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
10 µM “forward” Primer	2 µl	2 µl	-	2 µl
10 µM “reverse” Primer	2 µl	2 µl	2µl	-
DNA Template 100 ng/µl	1 µl	-	1 µl	1 µl
Pfu DNA – Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Bei jeder PCR werden außer der eigentlichen Reaktion auch Negativ-Kontrollen angesetzt:

1. Kontrolle: Um die PCR-Reagenzien auf Kontamination zu überprüfen, wird das DNA Template durch Ampuwa ersetzt.
2. Kontrolle: Um auszuschließen, dass der „forward“ Primer alleine durch Bindung an eine zweite, nicht errechnete Stelle eine PCR-Reaktion in Gang setzt.
3. Kontrolle: Um auszuschließen, dass der „reverse“ Primer alleine durch Bindung an eine zweite, nicht errechnete Stelle eine PCR-Reaktion in Gang setzt.

Sofort nach der Zugabe der Pfu-Polymerase werden die Proben in den „Thermo-Cycler“ gesetzt. Da der Deckel des Geräts beheizt ist und so ein Verdunsten der Proben nicht droht, ist das Übersichten der Proben mit Mineralöl nicht nötig. Ein Standard-Programm für den „Thermo-Cycler“ wird im Folgenden dargestellt:

Denaturieren der cDNA-Matrize zu Beginn:	5 Minuten	94°C
<b>3-Schritt PCR:</b>		
Denaturieren:	45 Sekunden	94°C
„Annealing“ <sup>a</sup> :	45 Sekunden	54°C bis 70°C
„Extension“:	60 Sekunden	72°C
Zahl der Zyklen:	20 bis 42	
Verlängerung der entstandenen PCR-Produkte am Ende:	10 Minuten	72°C
<sup>a</sup> Für jedes Primer-Paar muß die optimale „Annealing“-Temperatur ermittelt werden.		

Nach Beendigung des PCR-Programms können die Proben über Nacht bei 4°C oder für längere Zeit bei -20°C gelagert werden. Ein Aliquot der PCR-Reaktion wird auf ein geeignetes Agarose -Gel (siehe 2.2.2) aufgetragen. Findet sich nur

eine Bande in der erwarteten Größe, wird der Rest der PCR-Reaktion in den pCR-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> Vektor ligiert (siehe 2.2.4.2).

### 2.2.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Auftrennung doppelsträngiger, linearisierter DNA-Fragmente eignen sich Agarosegele. Standard-Agarose-Gele zwischen 0,5% und 1,8% trennen DNA-Fragmente zwischen 0,3 und 30 kb. Als Laufpuffer kann sowohl 1x TBE als auch 1x TAE verwendet werden, wobei TAE-Puffer für präparative Gele geeignet ist, während mit TBE-Puffer schärfere Banden und hochauflösendere Gele erzielt werden.

Materialien:

- verwendete Agarosen
  - Utrapure Agarose (Gibco BRL), für Standardanwendungen
  - Low Melt Agarose (Pepqlab, Erlangen, Deutschland), für präparative Gele
- 10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung
- 50x TAE-Puffer:
  - 242 g Tris-Base
  - 57,1 ml Essigsäure
  - 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0werden mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt.  
Zur Verwendung wird der Puffer 1:50 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.
- 10x TBE-Puffer:
  - 108 g Tris-Base
  - 55 g Borsäure
  - 4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0werden mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt.  
Zur Verwendung wird der Puffer 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.
- 10x Gelladepuffer:
  - 0,4% (w/v) Bromphenolblau (Sigma, Steinheim, Deutschland)
  - 0,4% (w/v) Xylen-Cyanol FF (Sigma)

20% Ficoll 400 (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)

Durch den Gelladepuffer wird die Dichte der Probe erhöht und ihr Einsinken in die Geltasche ermöglicht. Zusätzlich färbt er die Probe und erleichtert damit das Auftragen auf das Gel. Die in ihm enthaltenen Farbstoffe wandern mit reproduzierbarer Geschwindigkeit zur Anode.

- DNA Molecular Weight Marker III, VI und VII, 250 ng/µl (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Deutschland):

2 µl Marker (500 ng) werden mit 1,5 µl Gelladepuffer versetzt, mit 1x TAE oder 1x TBE auf 15 µl aufgefüllt und vollständig auf das Gel aufgetragen.

Geräte:

- Horizontale Gelapparatur ( Peqlab )
- Stromquelle

Arbeitsanweisung:

Gießen des Gels (1% Gel):

Das Volumen der herzustellenden Agarose-Lösung wird der Größe des jeweiligen Gelträgers angepasst. Ein Gelträger für die DNA Mini Gel Kammer fasst zum Beispiel 50 ml. 0,5 g Agarose werden mit 1x TBE- oder 1x TAE-Puffer auf 50 ml aufgegossen und im Mikrowellenherd so lange erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst ist. Verdampfte Flüssigkeit wird mit ddH<sub>2</sub>O ersetzt. Nach der Zugabe von 2,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung lässt man die Lösung auf 60 bis 70°C abkühlen, gießt sie in den Gelträger, setzt den gewünschten Kamm ein und lässt das Gel mindestens 30 Minuten erkalten und fest werden. Das Gel wird in die Kammer gesetzt und die Kammer mit 1x TBE- oder 1x TAE-Puffer gefüllt.

Probenvorbereitung:

Die Proben werden so mit Gelladepuffer versetzt, dass dieser 1:10 verdünnt vorliegt. Die Proben und der vorbereitete Molekulargewichtsstandard werden in die Taschen des Gels gefüllt.

Gel-Lauf und Dokumentation des Ergebnisses:

Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung, wobei 1 bis 10 V pro cm Gel angelegt werden. Während des Laufs interkalieren Ethidiumbromid-Moleküle in die DNA-Helix. Die Fluoreszenz der gefärbten DNA wird mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm angeregt. Mit Hilfe des Image Master VDS Systems werden die Banden digitalisiert und das Bild über einen Thermosublimationsdrucker ausgegeben.

Aus präparativen Gelen wird die gewünschte Bande auf einem UV-Leuchttisch (Bachhofer, Reutlingen, Deutschland) ausgeschnitten, wobei die UV-Bestrahlung der DNA so kurz wie möglich gehalten werden sollte, um Strangbrüche zu vermeiden.

### 2.2.3 Reinigung von DNA aus Low Melt Agarosegelen

Vor der Klonierung von PCR-Produkten ist die Reinigung der gewünschten Bande aus dem Gel erforderlich, um sie von unspezifischen Banden, Primern und nicht eingebauten Desoxyribonukleotiden (dNTPs) zu trennen. Die hier beschriebenen Methoden entsalzen die DNA Probe, entfernen Ethidiumbromid-Moleküle und Proteine.

#### 2.2.3.1 Wizard PCR Preps DNA Purification System

Materialien:

Folgende Materialien sind Bestandteil des „ Wizard PCR Preps DNA Purification System“ (Promega, Madison, USA):

- Wizard PCR Preps DNA Purification Resin
- Wizard Minicolumns

Arbeitsanweisung:

Die DNA wird in einem Agarose-Gel getrennt, wobei TAE dem TBE als Laufpuffer vorzuziehen ist, da das im TBE enthaltene Borat die Bindung der DNA an das Purification Resin behindern kann. Die gewünschte Bande wird,

wie unter 2.2.2 beschrieben, aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosevolumen sollte hierbei ungefähr 300 µl oder weniger betragen. Das Gelstück wird in einem Eppendorf Reaktionsgefäß bei 70 °C inkubiert bis die Agarose vollständig geschmolzen ist. Nach Zugabe von 1 ml DNA Purification Resin wird die Lösung durch Schütteln 20 Sekunden lang gründlich vermischt, aber nicht gevortext. Die Lösung wird in eine 3 ml Spritze, die auf einer Minisäule befestigt ist pipettiert. Der Spritzenstempel wird in den Spritzenkolben eingeführt und die Lösung vorsichtig in die Minisäule gedrückt. Anschließend die Spritze von der Minisäule abmontieren, den Stempel herausnehmen, und dann die Spritze wieder auf die Minisäule aufsetzen. Die Säule wird gewaschen indem 2 ml 80% Isopropanol in den Spritzenkolben pipettiert und mit dem Spritzenstempel langsam durch die Minisäule gedrückt werden. Die von der Spritze abmontierte Minisäule wird auf ein Eppendorfreaktionsgefäß gesteckt und nach 1 Minute 20 Sekunden mit 10000g zentrifugiert um die DNA zu eluieren. Die so aufgereinigte DNA kann bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

### 2.2.3.2 Geneclean II Kit

Materialien:

Folgende Materialien sind Bestandteil des „Geneclean II Kit“ (Bio 101 Inc., Carlsbad, USA) zur Reinigung von DNA-Fragmenten größer 500 bp:

- 6 M Natriumjodid-Lösung (NaI)
- TBE-Modifizier:  
Mischung aus hoch konzentrierten Salzen
- NEW Waschlösung:  
14 ml NEW Konzentrat werden mit 280 ml ddH<sub>2</sub>O vermischt. 310 ml absoluter Ethanol werden hinzugefügt, die Lösung gut gemischt und bei -20°C gelagert. Die NEW Waschlösung enthält Tris-HCl und Tris-Base, so dass der pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 liegt.
- Glasmilch:  
Silica-Matrix, gelöst in ddH<sub>2</sub>O

Bindungskapazität: 1 bis 2  $\mu\text{g}$  DNA pro  $\mu\text{l}$  Glasmilch

Sofern keine Pufferzusammensetzung angegeben ist, stellt diese ein Firmengeheimnis dar.

Arbeitsanweisung:

Die DNA wird in einem Agarose-Gel getrennt, wobei TAE dem TBE als Laufpuffer vorzuziehen ist, da das im TBE enthaltene Borat die Bindung der DNA an die Silica-Matrix behindern kann. Die gewünschte Bande wird, wie unter 2.2.2 beschrieben, aus dem Gel ausgeschnitten und das Gel-Stück gewogen. Nach Zugabe von 3 mal Gel-Volumen NaI-Lösung (in Anwesenheit von TBE  $\frac{1}{2}$  Gel-Volumen TBE-Modifier und 4,5 Gel-Volumen NaI-Lösung) wird das Gemisch so lange bei 45 bis 55°C inkubiert, bis sich das Gel-Stück vollständig aufgelöst hat. Vor Zugabe der Glasmilch muss die Silica-Matrix vollständig resuspendiert werden. Zu Lösungen, die 5  $\mu\text{g}$  DNA oder weniger enthalten, gibt man 5  $\mu\text{l}$  Glasmilch. Für jedes weitere  $\mu\text{g}$  DNA wird die zuzugebende Menge um 2  $\mu\text{l}$  erhöht. Bei stark verdünnten DNA-Lösungen sollte eher mehr Glasmilch als oben angegeben eingesetzt werden. Die Bindung der DNA an die Silica-Matrix benötigt auf Eis 15 Minuten bis 1 Stunde, wobei die Glasmilch zwischendurch immer wieder aufgeschüttelt werden sollte, um den Kontakt zwischen zu bindender DNA und den Partikeln zu gewährleisten. Anschließend wird die Glasmilch in einer Tischzentrifuge 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, der Überstand abgenommen und zunächst aufgehoben. Das Pellet wird in 10 bis 50 mal Glasmilch-Volumen NEW Waschlösung vorsichtig (um Strangbrüche bei langen DNA-Molekülen zu vermeiden) resuspendiert und erneut zentrifugiert; dieser Vorgang wird 2 mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet 10 Minuten unter Vakuum getrocknet, um Ethanol-Reste zu entfernen. Die Silica-Matrix wird schließlich in 1 bis 2 Glasmilch-Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 45 bis 55°C 5 Minuten inkubiert. Nach dem Pelletieren wird der Überstand, der die DNA enthält, abgenommen und die Elution wiederholt.

## 2.2.4 Klonierung der PCR-Produkte und Subklonierung des Inserts in den Expressionsvektor

### 2.2.4.1 Verwendete Plasmide

Für die Klonierung der PCR-Produkte und die Subklonierung des eigentlichen Inserts wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet: pCR - Blunt II TOPO und der pET-30a.

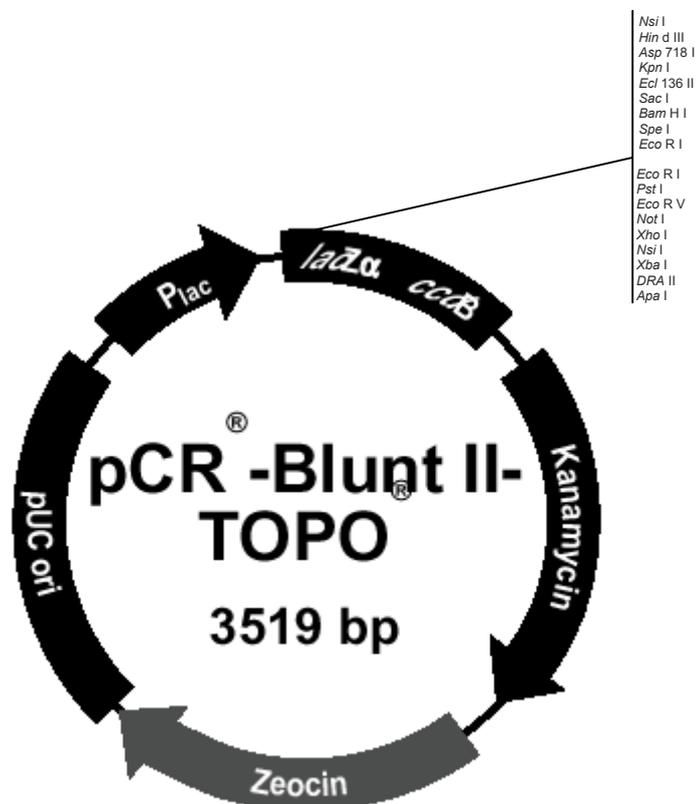


Abbildung 2.1: pCR-BLUNT II- TOPO®-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, California)

Wichtige Charakteristika:

- Kanamycin: Das Kanamycin-Resistenz Gen dient der Selektion transformierter Bakterien.
- Zeocin: Das Zeocin-Resistenz Gen dient ebenfalls der Selektion transformierter Bakterien.

- pUC ori: Der „origin of Replication“ (ori) ermöglicht eine hohe Anzahl von Kopien in E. coli.
- MCS: Die „multiple cloning site“ ist der Bereich, in den das Einklonieren des PCR-Produkts erfolgt.
- P<sub>lac</sub> und lacZ $\alpha$  ccdB: Diese beiden Teile des ccdB (control of cell death) Gens sind vor und nach der MCS gelegen. Das ccdB Protein vergiftet die bakterielle DNA Gyrase und führt dadurch zur Degradation des Wirtschromosoms und zum Zelltod. Wird ein Insert in den Vektor ligiert, ist das ccdB Gen unterbrochen und das entsprechende Protein kann nicht synthetisiert werden. Durch diesen Mechanismus wird hoher Vektor-Background vermieden.

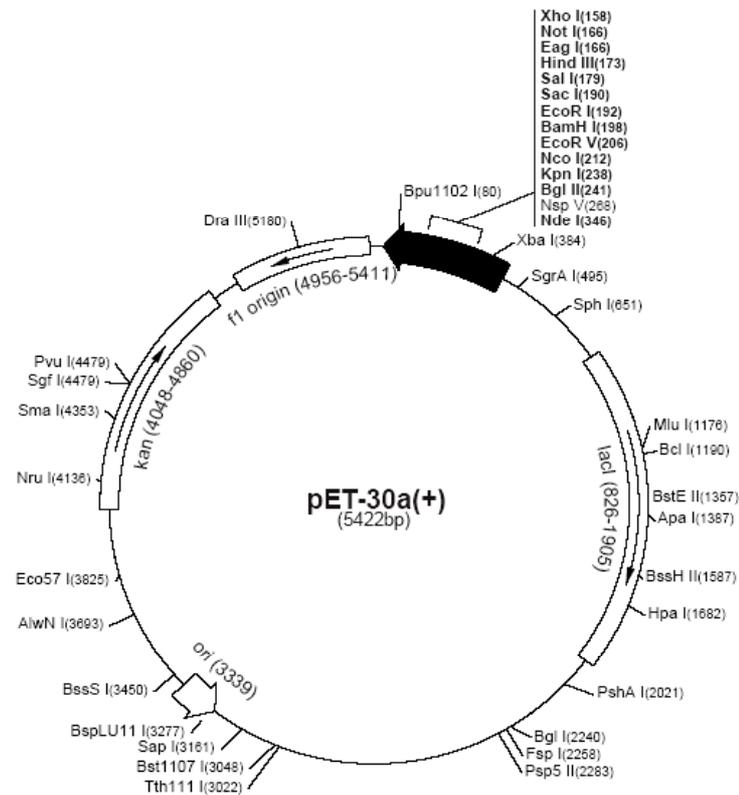


Abbildung 2.2: Die pET-30a-c(+) Vektorgruppe (Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Wichtige Charakteristika:

- Kanamycin: Das Kanamycin-Resistenz Gen dient der Selektion transformierter Bakterien.

- MCS: Die „multiple cloning site“ ist der Bereich, in den das Einklonieren des PCR-Produkts erfolgt.
- Fusion Tags: Das rekombinante Protein wird als Fusionsprotein exprimiert. Die in diesem Vektor vorhandenen Fusionspartner, N-terminaler Hexahistidin-Tag und S Tag, ermöglichen eine leichte und effiziente Aufreinigung und Detektion des Proteins, ohne dass seine biologische Aktivität wesentlich beeinflusst wird.
- T7-Promotor unter Lac Operator-Kontrolle: Im nicht induzierten Zustand unterdrückt der im Bakteriengenom und zusätzlich im pET-30a-c kodierte Lac Repressor die Expression der T7-RNA-Polymerase durch die bakterielle RNA-Polymerase. Da die bakterielle RNA-Polymerase den T7-Promotor des Zielproteins nicht erkennt und die basal exprimierte T7-RNA-Polymerase durch den hohen Lac Repressor-Spiegel inhibiert wird, findet keine Expression des rekombinanten Proteins statt.

Die Expression des Zielproteins wird durch IPTG angeschaltet. Der synthetische Lac-Operon-Inductor bindet und inaktiviert den Lac Repressor. Infolgedessen transkribiert die bakterielle RNA-Polymerase das T7-RNA-Polymerasegen. Von der so entstandenen mRNA wird durch den bakteriellen Translationsapparat funktionelle T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Die T7-RNA-Polymerase zeichnet sich durch eine sehr hohe Promotor-Selektivität aus, wodurch sie ausschließlich das einzige in der Zelle vorliegende Gen mit T7-Promotor transkribiert, das in den pET30 klonierte Zielgen. Aufgrund ihrer ungefähr 5mal größeren Elongationsgeschwindigkeit ist die T7-RNA-Polymerase der bakteriellen RNA-Polymerase im Wettbewerb um den zellulären NTP-Pool weit überlegen. Unter günstigen Bedingungen werden somit alle zellulären Ressourcen für die Produktion der Ziel-mRNA eingesetzt. Innerhalb von 1-3 Stunden kann die Ziel-mRNA daher rRNA vergleichbare Konzentrationen erreichen, so dass das Zielprotein einen Großteil des gesamten Zellproteins ausmacht.

### 2.2.4.2 DNA-Ligation mit dem Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit

An den Plasmidvektor pCR-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> ist eine DNA Topoisomerase I aus dem Vaccinia Virus kovalent an das 3'Ende jedes DNA-Stranges gebunden.

Diese Topoisomerase I ermöglicht eine effektive und schnell durchzuführende Ligation des Inserts in den Vektor, ohne dass eine separate DNA-Ligase verwendet werden muss.

Materialien:

- frisches PCR Produkt
- TOPO<sup>®</sup> Vector (Bestandteil des „Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen)

Arbeitsanweisung:

Je nach DNA-Konzentration werden zwischen 0,8 und 2 µl frisches PCR-Produkt mit sterilem Wasser auf 5 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach Vermischen der Lösung wird 1 µl TOPO Vektor hinzupipettiert und die Lösung erneut vorsichtig vermischt. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wird zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit dem Ligationsprodukt kann umgehend die Transformation der E. coli TOP10 Zellen durchgeführt werden (siehe 2.2.5.4).

### 2.2.4.3 DNA-Ligation mit dem Rapid „DNA Ligation Kit“

Folgende Materialien sind Bestandteil des „Rapid DNA Ligation Kit“ (Boehringer Mannheim):

- T4 DNA Ligationspuffer (2x)
- DNA Verdünnungspuffer (5x)
- T4 DNA Ligase (5 u/µl)

Die genaue Zusammensetzung der Puffer wird von der Firma nicht angegeben.

Arbeitsanweisung:

Um das Verhältnis DNA zu Vektor abzuschätzen, werden Vektor und Insert auf einem Agarose/TAE-Gel aufgetragen und anhand ihrer Intensität verglichen und dann wie folgt zusammenpipettiert.

	Real	Mock
Vektor	1 µl	1 µl
Insert	im Verhältnis 3:1 zum Vektor	-
DNA-Verdünnungspuffer (5x)	2 µl	2µl
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 µl auffüllen	
T4 DNA-Ligationspuffer (2x)	10 µl	10 µl
	Vermischen aller Komponenten	
T4 DNA-Ligase	1 µl	1 µl

Nach Zugabe der T4 DNA-Ligase wird die Probe erneut gemischt, durch kurzes Zentrifugieren gesammelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend können 5 µl des Ligationsprodukts sofort in *E. coli* transformiert und der Rest bei -20°C gelagert werden.

## 2.2.5 Transformation von *E. coli*

### 2.2.5.1 Verwendete Bakterienstämme

*E. coli* TOP10:

Diese bereits chemisch kompetent gelieferten Zellen (Invitrogen) zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus und eignen sich sehr gut zur Aufnahme von DNA, die nicht „supercoiled“ ist. Der Genotyp der TOP10 Zellen entspricht dem des DH10B Stamms und weist folgende Eigenschaften auf:

- *hsdR* für effiziente Transformation unmethylierter DNA
- *mcrA* für effiziente Transformation methylierter DNA
- *lacZ*Δ*M15* für blau/weiß Farbscreening von rekombinanten Klonen

E. coli NM 522:

Dieser Bakterienstamm zeichnet sich durch schnelles Wachstum und gute Transformierbarkeit aus. Er weist folgende genotypischen Merkmale auf:

*supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK- mK+) [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]*

Durch das enthaltene F' episome besteht die Möglichkeit zur Herstellung von doppelsträngiger DNA und zur blau/weiß Farbselektion.

E. coli BL 21 (DE3):

Diese Zellen wurden entwickelt, um einen höheren Proteinertrag zu erhalten, wozu sie mit der T7 RNA Polymerase aus dem Bakteriophagen  $\lambda$  DE3 transformiert wurden. Da diese Polymerase mRNA deutlich schneller synthetisiert als die E.coli RNA Polymerase, erfolgt die Transkription vom T7 Promotor unabhängig von der Translation im E. coli. Dies führt dazu, dass die mRNA-Transkripte nicht durch Ribosomen geschützt sind und somit enzymatischem Verdau durch endogene RNasen ausgesetzt sind. Um dies zu verhindern, und dadurch eine höhere Proteinausbeute zu erzielen, wurde in das Zellgenom eine Mutation eingefügt. Diese betrifft das Gen *rne131*, welches für die RNase E codiert, die der Hauptmechanismus für mRNA Abbau ist.

### 2.2.5.2 Herstellung von Medien für die Bakterienkultur

- 100 mg/ml Ampizillin-Stammlösung:  
1g Ampizillin (Sigma) wird in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.
- 25 mg/ml Kanamycin-Stammlösung:  
0,25g Kanamycin (Sigma) wird in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.
- LB-Medium:  
10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL)  
5 g Hefeextrakt (Gibco BRL)  
5 g NaCl

werden eingewogen, in ddH<sub>2</sub>O gelöst, mit 5 M NaOH auf pH7,5 eingestellt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert. Das Medium wird bei 4°C gelagert.

- LB-Agar-Platten:

10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL)

5 g Hefeextrakt (Gibco BRL)

5 g NaCl

15 g Bacto-Agar (Gibco BRL)

Die Komponenten werden eingewogen, in ddH<sub>2</sub>O gelöst, mit 5 M NaOH auf pH7,5 eingestellt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert. Wenn die Agar-Lösung auf 55°C abgekühlt ist, wird sie kurz gemischt und in sterile Petri-Schalen (Greiner, Flacht, Deutschland) gegossen (ca. 50 ml/ Schale). Nachdem der LB-Agar fest geworden ist, werden die Platten gut verschlossen bei 4°C gelagert.

- LB-Amp-Platten (Selektionsplatten):

Nach dem Abkühlen, kurz vor dem Gießen, wird 1 Liter der LB-Agar-Lösung mit 1 ml Ampizillin-Stammlösung (100 mg/ml) versetzt.

- LB-Kana-Platten (Selektionsplatten):

Nach dem Abkühlen, kurz vor dem Gießen, wird 1 Liter der LB-Agar-Lösung mit 1 ml Kanamycin-Stammlösung (25 mg/ml) versetzt.

- 200 mg/ml IPTG (Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid), (Roth, Karlsruhe, Deutschland):

1 g IPTG wird in 5 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

- SOB-Medium:

20,0 g Bacto-Trypton (Gibco BRL)

5,0 g Hefeextrakt (Gibco BRL)

0,5 g NaCl

Die Komponenten werden eingewogen, mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden 1 ml 2 M KCl<sub>2</sub> (steril filtriert) und 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril filtriert) hinzugefügt. Das Medium wird in 50 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

- SOC-Medium:  
SOB-Medium werden frisch 1 ml 2 M steril filtrierte Glukose zugefügt.

Wenn *E. coli* in Flüssigkultur kultiviert werden, wird zunächst eine kleine Menge Zellen in sterilem Medium (zum Beispiel LB-Medium) inokuliert. Nach einem Zeitintervall, das lag-Phase genannt wird, beginnen sich die Bakterien alle 20 bis 30 Minuten zu teilen. Diese Phase des exponentiellen Wachstums wird log-Phase genannt und in eine frühe, mittlere und späte log-Phase unterteilt. Wenn der Sauerstoff knapp wird oder die Konzentration an Stoffwechselprodukten zu hoch wird, verlangsamt sich das Wachstum. Die Kultur befindet sich in der Sättigungs-Phase.

### 2.2.5.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation

Im Gegensatz zu anderen Bakterien (zum Beispiel *Bacillus subtilis*) nimmt *E. coli* spontan keine Fremd-DNA auf, weshalb *E. coli* Zellen vor der Transformation kompetent gemacht werden müssen.

Materialien:

- TFB1-Puffer:  
100 mM RbCL  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
30 mM Kaliumacetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerol  
Mit HCl auf pH 5,8 einstellen (vorsichtig, da Mangan ausfallen kann) und anschließend sterilfiltrieren.
- TFB2-Puffer  
10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerol

mit KOH auf pH 6,8 einstellen und anschließend sterilfiltrieren.

Arbeitsanweisung:

E. coli NM 522 werden mit einer Impföse aus einer tiefgefrorenen Glycerinkultur in 3 ml LB-Medium überführt und unter Schütteln (250 rpm) über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wird 1 ml dieser gesättigten Kultur in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und weiterhin bei 37°C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wird durch photometrische Messung bei 600 nm überwacht. Sobald sich die Zellen in der frühen log-Phase befinden ( $OD_{600} \sim 0,5$ ), wird die Kultur für 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen werden durch 5 Minuten Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C gesammelt, der Überstand verworfen, die Bakterien vorsichtig in 30 ml 4°C kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut durch 5 Minuten Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C gesammelt, der Überstand verworfen und die Zellen in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. 200 µl Aliquots der Bakterien-Suspension werden in sterile vorgekühlte 2 ml Reagenzgefäße mit Schraubverschluss pipettiert und im Ethanol/Trockeneis-Bad schockgefroren. Die kompetenten Bakterien werden bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.5.4 Transformation von E. coli TOP10 One Shot Cells

Materialien:

- One Shot<sup>®</sup> TOP10 chemisch kompetente E. coli (Invitrogen)
- LB-Kanamycin-Platten
- SOC-Medium

Arbeitsanweisung:

Vorbereitend müssen das Wasserbad auf 42°C eingestellt, das SOC-Medium auf Raumtemperatur vorgewärmt, die LB-Platten 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die One Shot Zellen auf Eis aufgetaut werden.

2 µl des Ligationsprodukts aus der TOPO<sup>®</sup> Cloning-Reaktion (2.2.4.2) werden in das Reaktionsgefäß mit den bereits aufgetauten Zellen überführt und durch

„Schnippen“ vorsichtig gemischt. Keinesfalls dürfen die Zellen auf- und abpipettiert werden. Die Bakterien werden 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann 30 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und umgehend wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium werden die Zellen in horizontaler Lage für 1 Stunde unter Schütteln (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Es werden 50 µl und 200 µl des Kulturvolumens zur Selektion auf LB-Kanamycin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.5.5 Transformation von E. coli NM 522 und BL 21-DE3

Materialien:

- kompetente E. coli, NM 522 oder BL 21-DE3
- LB-Platten, mit dem Plasmid entsprechenden Antibiotika
- SOC-Medium

Arbeitsanweisung:

Vorbereitend muss das Wasserbad auf 42°C eingestellt, das SOC-Medium auf Raumtemperatur vorgewärmt, die LB-Platten 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut werden.

100 µl der kompetenten Zellen werden in ein vorgekühltes 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl Ligationsprodukt aus der Ligationsreaktion des Rapid „DNA Ligation Kit“ (2.2.4.3) wird das Reaktionsgefäß 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen werden dann 90 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und umgehend wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium werden die Zellen in horizontaler Lage für 1 Stunde unter Schütteln (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Es werden 50 µl und 200 µl des Kulturvolumens zur Selektion auf den entsprechenden LB-Platten mit Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.6 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterien über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden. In glyzerinhaltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen praktisch unbegrenzt lagern, ohne ihre Vitalität zu verlieren.

Materialien:

- Glycerin (Sigma), autoklaviert

Arbeitsvorschrift:

Je 850 µl einer Über-Nacht-Kultur in LB-Amp-Medium, die sich in der frühen Sättigungs-Phase befindet, wird mit 150 ml sterilem Glycerin gründlich gemischt, im Trockeneis/Ethanol-Bad schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Zum Animpfen aus einer Glycerinkultur wird mit einer Impföse ein kleiner Teil der gefrorenen Glycerinkultur abgenommen und entsprechend, der durch den Vektor kodierten Resistenz, in das gewünschte Medium überführt oder auf einer LB -Platte ausgestrichen.

### 2.2.7 Plasmidpräparation

Beiden im Folgenden beschriebenen Methoden liegt dasselbe Prinzip zugrunde: Nach Anzucht im geeigneten Selektionsmedium werden die transformierten Bakterien durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und einer alkalischen Lyse mit NaOH/SDS unterworfen (5). Dies führt zur Lyse der Zelle und zur Denaturierung der bakteriellen Proteine. Die Plasmid-DNA und in geringem Maße auch die chromosomale DNA werden freigesetzt und ebenfalls denaturiert. Anschließend erfolgt die Neutralisierung des Lysats unter Hochsalzbedingungen. Hierbei renaturiert die Plasmid-DNA während die anderen makromolekularen Komponenten als Präzipitat ausfallen.

### 2.2.7.1 DNA Mini-Präparation zur Charakterisierung der Transformanten

Nach der Transformation wachsen auf den Agarplatten nur die Bakterienklone, die ein Plasmid enthalten, welches das entsprechende Resistenz-Gen überträgt. Im Schnelltest werden die Klone auf das Vorhandensein des richtigen Inserts überprüft.

#### Materialien:

- Puffer P1 (Resuspendierungspuffer), pH 8,0:
  - 100 µg/ml RNase A
  - 50 mM Tris/HCl
  - 10 mM EDTADer Puffer wird nach Zugabe der RNase A bei 4°C gelagert.
- Puffer P2 (Lyse-Puffer):
  - 200 mM NaOH
  - 1% SDS
- Puffer P3 (Neutralisierungspuffer), pH 5,5:
  - 3,0 M KaliumacetatDer Puffer wird bei 4°C gelagert.
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25 : 24 : 1), gesättigt mit TE Puffer (Roth)
- Ethanol abs., eiskalt
- 70 % Ethanol, eiskalt

#### Arbeitsvorschrift:

Von einer Agarplatte werden einzelwachsende Bakterienklone gepickt und in 2 ml LB-Medium, dem 2 µl Ampicillin (100mg/ml) oder 2 µl Kanamycin (25 mg/ml) zugesetzt sind, unter Schütteln (250 rpm) ungefähr 16 Stunden bei 37°C kultiviert. Je 1,5 ml Bakteriensuspension werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und 30 Sekunden bei 15300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgesaugt, das Pellet in 100 µl RNase haltigem Resuspendierungspuffer aufgenommen und gevortext. 100 µl Lyse-Puffer

werden zugegeben, der Inhalt des Eppendorf-Reagenzgefäßes durch Wenden gemischt und die Suspension 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wird mit 100 µl Neutralisierungspuffer neutralisiert, sofort durch Wenden gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 15300 rpm und 4°C wird der klare Überstand (ca. 250-300 µl) in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und 500 µl des Phenol-Chloroform-Isoamylalkoho-Gemisch zugegeben und für 30 Sekunden gevortext. Nach 3 Minuten Zentrifugation bei 15300 rpm und 4°C wird der Überstand (ca. 200-250 µl), die obere Phase, in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass nichts von der unteren Phenol-Chloroform-Phase verschleppt wird. Der Suspension werden 2-3 Volumen eiskalter absoluter Ethanol zugegeben und nach kurzem vortexen wird die Plasmid-DNA bei -70°C für 20 Minuten gefällt. Die DNA wird durch 20 Minuten Zentrifugation bei 15300 rpm und 4°C pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet durch Zugabe von 300 µl Ethanol 70% gewaschen. Nach einem weiteren 2 minütigem Zentrifugationsschritt mit 15300 rpm und 4°C wird der Überstand abgesaugt, das Pellet 10 Minuten unter Vakuum getrocknet und schließlich in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Um festzustellen, ob die gewonnene Plasmid-DNA das gewünschte „Insert“ enthält, werden je 10 µl der Präparation mit geeigneten Restriktionsenzymen (siehe 2.2.8) geschnitten und in einem Agarose/TBE-Gel (siehe 2.2.2) getrennt.

### 2.2.7.2 Midi-Präparation zur Plasmidgewinnung

Um größere Mengen (ca. 100 µg) sauberer Plasmid-DNA zu erhalten, wird eine Midi-Präparation mit dem Plasmid-Kit von Qiagen durchgeführt.

Materialien:

- Isopropanol
- 70% Ethanol

Folgende Materialien sind Bestandteil des „Plasmid Midi Kits“ (Qiagen):

- Puffer P1 (Resuspendierungspuffer), pH 8,0:
  - 100 µg/ml RNase A
  - 50 mM Tris/HCl
  - 10 mM EDTADer Puffer wird nach Zugabe der RNase A bei 4°C gelagert.
- Puffer P2 (Lyse-Puffer):
  - 200 mM NaOH
  - 1% SDS
- Puffer P3 (Neutralisierungspuffer), pH 5,5:
  - 3,0 M KaliumacetatDer Puffer wird bei 4°C gelagert.
- Puffer QBT (Äquilibriumspuffer), pH 7,0:
  - 750 mM NaCl
  - 50 mM MOPS
  - 15% Ethanol
  - 0,15% Triton X-100
- Puffer QC (Waschpuffer), pH 7,0:
  - 1,0 M NaCl
  - 50 mM MOPS
  - 15% Ethanol
- Puffer QF (Elutionspuffer), pH 8,5:
  - 1,25 M NaCl
  - 50 mM Tris/HCl
  - 15% Ethanol
- Qiagen Säule 100 (DNA-Bindungskapazität: 100 µg):

Die Säule enthält Silica-Gel, dessen 100 µM Partikel an ihrer Oberfläche modifiziert wurden. Die Bindung der DNA erfolgt über Anionen-Austausch Gruppen an der Oberfläche des Materials. Bei pH 8,5 und einer NaCl-Konzentration von mindestens 1,25 M wird ausschließlich Plasmid-DNA eluiert, Proteine, RNA, Nukleotide und Oligonukleotide bleiben an das Säulenmaterial gebunden.

Die genaue Zusammensetzung der Säule wird von der Firma nicht angegeben.

Arbeitsvorschrift:

Über-Nacht-Kultur der Bakterien:

Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um „high copy“-Plasmide, von denen 300 bis 500 Kopien in einer Bakterienzelle vorhanden sein können. Pro ml Kulturmedium kann mit einer Plasmid-DNA Ausbeute von 3 bis 5  $\mu\text{g}$  gerechnet werden, weshalb ein Kulturvolumen von 50 ml sinnvoll ist. 50 ml LB-Amp-Medium (siehe 2.2.5.2) werden mit einem gepickten Bakterienklon inokkuliert und 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Die Bakterien werden durch 10 Minuten Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C geerntet. Nach gründlichem Absaugen des Überstandes kann das Pellet bei -20°C eingefroren und gelagert oder sofort zur Plasmidisolierung eingesetzt werden.

Alkalische Lyse:

Das Bakterien-Pellet wird in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, so dass keine Zellklumpen zurückbleiben. 4 ml Puffer P2 werden hinzugegeben und die Suspension sofort vorsichtig durch Wenden des Röhrchens gemischt. Die Zellen werden genau 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe von kaltem Puffer P3 erfolgt die Neutralisation. Die Suspension wird nach vorsichtigem Mischen 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Ist der Überstand klar, wird er auf die äquilibrierte Säule aufgetragen, ansonsten wird er in ein neues Röhrchen überführt und erneut, wie beschrieben, zentrifugiert.

Säulenreinigung der Plasmid-DNA:

Die Qiagen Säule 100 wird mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Nachdem er vollständig in die Säule eingedrungen ist, wird der klare Überstand aufgetragen und erneut gewartet bis der Meniskus den oberen Anteil des Säulenmaterials

erreicht hat. Die Säule wird 2 mal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert.

Isopropanol-Fällung:

Dem Eluat werden 0,7 Volumen auf Raumtemperatur äquilibriertes Isopropanol hinzugefügt und das Gemisch bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 15 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, 10 Minuten unter Vakuum getrocknet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wird photometrisch (siehe 2.2.9) bestimmt, die Qualität der DNA nach einem Restriktionsverdau (siehe 2.2.8) auf einem Agarose-Gel (siehe 2.2.2) überprüft.

### 2.2.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der DNA-Verdau ist bei der Klonierung unentbehrlich, seinen Einsatz findet er vor allem bei den folgenden drei Arbeitsschritten:

- Überprüfung transformierter Bakterien auf die richtige Orientierung des Inserts.
- Ausschneiden von DNA aus einem Plasmid, die in einen anderen Vektor subcloniert werden soll.
- „Aufschneiden“ eines Vektors zum Einfügen des gewünschten Inserts mittels Ligation.

Restriktionsendonukleasen von Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Sie erzeugen dabei entweder 3'- oder 5'-überhängende Enden einzelsträngiger DNA („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“). Je nach Enzym variieren Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei denen die Reaktion bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit optimal abläuft.

**Materialien:**

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, einschließlich der zugehörigen Reaktionspuffer stammen von den Firmen Boehringer Mannheim und New England Biolabs (Beverly, USA).

**Arbeitsvorschrift:**

Folgende Komponenten werden gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt:

Plasmid-DNA	x µg
Restriktionsenzym (10 u/µl)	2 u/µg Plasmid-DNA
Reaktionspuffer (10x)	<sup>1</sup> / <sub>10</sub> Endvolumen
Der Ansatz wird mit ddH <sub>2</sub> O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt.	

Der Verdau erfolgt 2 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

**2.2.9 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen**

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der heterozyklischen, aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen im Bereich von 260 nm ausgenutzt (80). Hierbei ist zu beachten, dass Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA, RNA und Oligonukleotide infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Extinktionskoeffizienten besitzen. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA und RNA ca. 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden ca. 20 µg/ml. Zur Bestimmung sehr kleiner Nukleinsäure-Mengen ist die Methode nicht geeignet. Die Messlösung muss zur Konzentrationsbestimmung im Einkanal-UV-VIS-Spektrometer (Beckman DU-640) mindestens 1 µg/ml enthalten.

Um die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen zu können, ist eine 2. Extinktionsmessung bei 280 nm nötig, bei der die aromatischen Reste von Proteinen stark absorbieren. Gereinigte DNA-Lösungen sollten ein  $E_{260}/E_{280}$ -

Verhältnis von 1,8 bis 2,0 aufweisen, wobei diese Ratio in TE-Puffer einen höheren Wert annimmt als in ddH<sub>2</sub>O.

Arbeitsvorschrift:

Die DNA-Lösung wird gewöhnlich 1:100 in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer verdünnt. Für die Leerwert-Bestimmung wird die Küvette (Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas, Beckman) mit 150 µl der Flüssigkeit gefüllt, in der die DNA gelöst ist und die Extinktion bei 260 und 280 nm im Einkanal-UV-Vis-Spektrometer (DU-640 von Beckman, Fullerton, USA) gemessen. Anschließend werden 150 µl der DNA-Verdünnung in die Küvette gefüllt und die Extinktion bei den genannten Wellenlängen gemessen. Vom jeweiligen Messwert zieht das Gerät jeweils den Leerwert ab. Die tatsächliche Nukleinsäure-Konzentration in der Ausgangsprobe wird wie folgt berechnet:

$$[\text{dsDNA}] = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.2.10 Expression und Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen

Materialien:

- 0,84 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Roth)
- Ni-NTA Agarose Beads (Qiagen)  
Bindungskapazität: 5-10 mg 6xHis-tagged Protein/ml, 5%ige Suspension
- Equilibrationspuffer, pH 8,0  
50 mM TRIS  
500 mM NaCl
- Waschpuffer, pH 8,0  
50 mM TRIS  
500 mM NaCl  
10 mM Imidazol
- Elutionspuffer, pH 8,0  
50 mM TRIS  
500 mM NaCl

1000 mM Imidazol

- Proteaseinhibitoren (Fluka, Buchs, Deutschland):

1 M Phenanthrolin

200 mM PMSF

18 mg/ml Aprotinin

Arbeitsvorschrift:

Das gesamte Verfahren sollte bei 4°C im Kühlraum durchgeführt werden, um Degradation der Proteine zu vermeiden. Die verwendeten Puffer sollten bei 4°C gelagert werden.

3 ml LB-Kanamycin-Medium werden aus der bei -80°C gelagerten Glycerinkultur angeimpft und unter Schütteln (250 rpm) 16 Stunden bei 37°C kultiviert. Von dieser Kultur werden 1500µl in 150 ml LB-Kanamycin-Medium überführt, für 2 Stunden bei 37°C kultiviert und nach Induktion mit 0,7 mM IPTG für weitere 4 Stunden kultiviert. Die Bakterien werden durch 20 Minuten Zentrifugation bei 4000xg geerntet. Nach gründlichem Absaugen des Überstandes kann das Pellet bei -20°C eingefroren und gelagert oder sofort weiterverarbeitet werden. Das Pellet wird in 10 ml Equilibrationspuffer und je 10 µl Proteaseinhibitoren resuspendiert. Durch 3maliges Sonifizieren (Behandlung mit Ultraschall) mit jeweils 200 Impulsen werden die Zellen aufgebrochen und das Protein freigesetzt. Die Suspension wird 20 Minuten mit 15300 rpm und 4°C zentrifugiert. Parallel dazu werden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) 0,5 ml der Ni-NTA Agarose Beads Suspension zweimal mit jeweils 8 ml Equilibrationspuffer gewaschen und in dem Überstand aus dem Zentrifugationsschritt resuspendiert. Nach 1 Stunde Rotation bei 4°C wird die Ni-NTA Agarose Beads Suspension mit 8 ml Waschpuffer 5 mal wie folgt gewaschen: Zentrifugation für 1 Minute bei 4°C und 1000 rpm, Absaugen des Überstandes mit einer serologischen Pipette, Resuspension in 8 ml Waschpuffer und gründliches Durchmischen durch Schütteln. Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden die Ni-NTA Agarose Beads mit einer kleinen Menge Waschpuffer in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt, für 1 Minute bei

4°C mit 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Restloses Entfernen des Waschpuffers ohne Verlust von Ni-NTA Agarose Beads gelingt, indem man die Suspension mit einer Gelladepipettenspitze "durchsticht" und absaugt. Die Beads werden in 1100 µl Elutionspuffer resuspendiert, 20 Minuten bei 4°C rotiert, 1 Minute bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert und schließlich der Überstand in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Bei Bedarf kann ein zweiter Eluationsschritt unternommen werden.

Die so aufgereinigte Proteinlösung kann jetzt aliquotiert und bei -80°C gelagert werden. Die Proteinkonzentration wird nach Lowry bestimmt (siehe 2.3.1) und die Reinheit in einer Coomassie gefärbten SDS-PAGE überprüft (siehe 2.3.2). Für die Weiterverarbeitung der Proteine ist allerdings zu beachten, dass der zu Elution benutzte Puffer 1000 mM Imidazol enthält und somit sowohl die Osmolarität als auch die Pufferkapazität erhöht sind.

### 2.2.11 Expression von in vivo biotinylierten Proteinen im pinPoint-System

Materialien:

- 50 mM Biotin
- 0,84 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)
- Proteaseinhibitoren :
  - 1 M Phenanthrolin
  - 200 mM PMSF
  - 18 mg/ml Aprotinin
- TBS-Puffer pH 8,0
  - 150 mM NaCl
  - 20 mM TRIS

Arbeitsvorschrift:

3 ml LB-Ampicilin-Medium werden aus der bei -80°C gelagerten Glycerinkultur angeimpft und unter Schütteln (250 rpm) 16 Stunden bei 37°C kultiviert. Von

dieser Kultur werden 2 ml in 200 ml LB-Ampicilin-Medium überführt und 200 µl 50 mM Biotin zugegeben. Der Ansatz wird für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und nach Induktion mit 0,7 mM IPTG für weitere 7 Stunden kultiviert. Die Bakterien werden durch 5 Minuten Zentrifugation bei 4000 rpm in je einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) geerntet, wobei der Überstand verworfen wird. Ist eine höhere Proteinkonzentration gewünscht, wird ein Zentrifugenröhrchen ein zweites Mal mit Bakteriensuspension befüllt und erneut zentrifugiert. Das Pellet kann bei -20°C gelagert werden oder sofort in 10 ml TBS-Puffer sorgfältig resuspendiert und 3 mal mit je 200 Impulsen sonifiziert werden. Nachdem die Suspension 20 Minuten mit 15300 rpm und 4°C zentrifugiert wurde, kann der Überstand zur Analyse weiter verwendet werden.

### 2.2.12 Synthetisch hergestellte Peptide

Die für den quantitativen Interaktions-ELISA benötigten 20 Aminosäuren langen Peptide, die an ihrem N-terminalen Ende einen Biotin-Tag tragen, wurden durch Dr. H. Kalbacher und Mitarbeiter (Arbeitsgruppe Peptidsynthese, Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum) hergestellt. Die Peptide wurden nach Synthese lyophilisiert und anschließend HPLC-gereinigt.

Peptid	Sequenz	MG
B-DRA-ETKF	Biotin-INTNGGLRNRVYEV <u>PVETKF</u>	2532 g/mol
B-DRA_GGGG	Biotin-INTNGGLRNRVYEV <u>PVGGGG</u>	2255 g/mol
B-CFTR_CTRL	Biotin-KPQIAALKEETEEEE <u>VQDTRL</u>	2553 g/mol
B-CFTR_GGGG	Biotin-KPQIAALKEETEEEE <u>VQGGGG</u>	2296 g/mol

Die Peptide wurden in DMSO (Sigma) gelöst (50 µl / mg Peptid) und anschließend mit TBS auf 1000 µl aufgefüllt. Die Peptide lagen somit als 1 mM Stammlösung vor.

## 2.3 Analyse von Proteinen

### 2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Lowry-Methode zur Proteinbestimmung ist eine Erweiterung der Biuret-Methode. Im ersten Reaktionsschritt wird ein Kupfer-Protein Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz), wobei eine intensiv blaue Färbung entsteht, deren Extinktion gemessen wird.

Materialien:

- CTC-Reagenz:
  - 0,1 % Kupfersulfat  $5\text{H}_2\text{O}$
  - 0,2 % Kaliumnatriumtartrat
  - 10% Natrium - Karbonat
- 5% SDS (Natriumdodecylsulfat)
- 0,8 N Natrium - Hydroxid
- Folin - Ciocalteu - Phenolreagenz (Merck)
  - Natriumwolframat
  - Natriummolybdat
  - Lithiumsulfat
  - Brom
  - Phosphorsäure 85 %
  - Salzsäure 35 %
- Bovines Serumalbumin (BSA) 1mg/ml

Arbeitsvorschrift:

Am Versuchstag werden die Reaktionslösungen A und B wie folgt hergestellt.

#### Lösung A

CTC – Reagenz	1 Teil
5% SDS	2 Teile

### Lösung B

Folin - Ciocalteu - Reagenz	1 Teil
H <sub>2</sub> O	5 Teile

Von den zu bestimmenden Proteinlösungen werden jeweils 3 Proben à 15, 33 und 100 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 800 µl Lösung A wird der Inhalt durch Wenden gründlich gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Lösung B und 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben in Kunststoffküvetten überführt. Im Photometer (Beckmann) wird die Extinktion der Proben bei 750 nm gegen Wasser gemessen. Zusätzlich wird bei jeder Messreihe eine Standardreihe mit 0, 10, 20, 40 und 80 µg BSA mitgeführt, aus der das Photometer eine Standardgerade ermittelt, die weder linear ist, noch durch den Nullpunkt verläuft.

### 2.3.2 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Proben, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden sollen, werden zunächst in Anwesenheit des starken anionischen Detergenz SDS und eines reduzierenden Agens durch Erhitzen denaturiert. Die denaturierten Polypeptide binden SDS und erhalten so eine negative Ladung. Die Menge an gebundenem SDS ist dem Molekulargewicht des Polypeptids proportional und unabhängig von der Aminosäuresequenz, was dazu führt, dass die SDS beladenen Polypeptide im Polyacrylamid-Gel auf ihrem Weg zur Anode nach der Größe getrennt werden. Modifikation der Polypeptid-Kette durch Glykosylierung hat signifikanten Einfluss auf das Molekulargewicht; glykosylierte Proteine laufen also nicht der Masse ihrer Polypeptid-Kette entsprechend.

Die Elektrophorese wird mit einem diskontinuierlichen Puffer-System durchgeführt: Das Sammelgel enthält Tris-HCl (pH 6,8), das Trenngel Tris-HCl (pH 8,8) und der Laufpuffer Tris-Glycin (pH 8,3). Alle Komponenten des Systems enthalten 0,1% SDS. Die SDS-Polypeptid-Komplexe werden nach dem Auftragen und der Wanderung durch das Sammelgel in einer schmalen

Zone an der Grenzlinie zum Trenngel konzentriert. Das Sammeln der Proben vor Einlaufen in das Trenngel erhöht die Auflösung der SDS-PAGE erheblich.

Polyacrylamid-Gele bestehen aus polymerisiertem Acrylamid, das durch das bifunktionale Agens Bisacrylamid quervernetzt ist. Sowohl die Prozentigkeit des Polyacrylamid-Gels als auch der Grad der Quervernetzung der Polymers sind für die Auflösung entscheidend:

Acrylamid (%) <sup>a</sup>	Auflösung des Gels für Polypeptide (kD)
5,0	57 bis 212
7,5	36 bis 94
10	16 bis 68
15	12 bis 43
<sup>a</sup> Acrylamid/ Bisacrylamid = 29:1	

Materialien:

- 30% Acrylamid-Stammlösung (Roth), (Acrylamid / Bisacrylamid = 29 : 1)
- 10% Ammoniumpersulfat (APS):  
Nach Herstellung der Lösung wird sie in Aliquots bei -20°C gelagert. Bei 4°C ist sie nur wenige Stunden haltbar.
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
- 5x Laufpuffer, pH 8,3:  
15 g Tris Base  
72 g Glycin  
5 g SDS  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und die Lösung mit HCl auf pH 8,3 einstellen. Zur Verwendung wird der Puffer 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.
- Probenpuffer (reduzierend):

0,625 M Tris-HCl	2 ml	Endkonz.: 0,125 M
10 % SDS	5 ml	Endkonz.: 5 %
2β-Mercaptoethanol	1 ml	Endkonz.: 10 %
Glycerin	2 ml	Endkonz.: 20 %
1 % Bromphenolblau in Ethanol abs.	0,2 ml	Endkonz.: 0,02 %

- Molekulargewichtsstandard:  
High-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences)

Geräte:

- Vertikale Gelapparatur Mini-Protean II (BioRad, Hercules, USA)
- Stromquelle

Arbeitsvorschrift:

Gießen des Gels:

Die Glasplatten, zwischen welche die Acrylamid-Lösung gegossen wird, werden gründlich mit Wasser und Seife gereinigt, mit 70% Ethanol gespült und getrocknet. Die Glasplatten werden aufeinandergelegt und in die Halterung eingeschraubt, 1,5 mm dicke Spacer am linken und rechten Rand sorgen für einen schmalen Zwischenraum. Durch Einklemmen der Halterung in die Gießvorrichtung wird diese unten abgedichtet und ein Ausfließen der Acrylamid-Lösung verhindert.

Die Komponenten werden in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

Trenngel <sup>a</sup>	E	7,0% Gel	8,0% Gel	8,5% Gel	10,0% Gel	12,0% Gel
30% Acrylamidstammllsg.	ml	2,3	2,7	2,8	3,3	4,0
1,5 M TRIS - HCL, pH 8,8	ml	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10% SDS	µl	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ddH <sub>2</sub> O	ml	5,0	4,6	4,5	4,0	3,3
10% APS	µl	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
TEMED	µl	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

<sup>a</sup> Menge ausreichend für zwei 0,75 mm dicke Gele oder ein 1,5 mm dickes Gel

Sobald TEMED zugefügt wird, beginnt die Polymerisation. Die Trenngel-Lösung wird in den Spalt zwischen den Glasplatten gegossen, wobei am oberen Rand genügend Platz für ein Sammelgel (ca. 3 cm) gelassen wird. Danach wird die Gel-Lösung sofort mit Isopropanol überschichtet, um zu verhindern, dass Sauerstoff in das Gel diffundiert und die Polymerisation beeinträchtigt. Nach 30 Minuten ist die Polymerisation abgeschlossen, das Isopropanol wird vollständig entfernt und der obere Rand des Gels mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Mit Hilfe eines

Filterpapiers wird verbliebenes Wasser entfernt. Es folgt die Herstellung der Sammelgel-Lösung, wobei die angegebene Reihenfolge eingehalten wird:

Sammelgel	E	Stacking
30% Acrylamidstammlsg.	ml	0,85
1 M Tris-HCl, pH6,8	ml	0,625
10% SDS	µl	50
ddH <sub>2</sub> O	ml	3,4
10% APS	µl	50
TEMED	µl	5

Die Sammelgel-Lösung wird nun direkt auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Zur Formung der Gel-Taschen wird sofort der Kamm eingesetzt und darauf geachtet, dass hierbei keine Luftblasen entstehen. Nach 30 Minuten ist auch die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen.

Probenvorbereitung:

Die aufzutragenden Proben und der Molekulargewichtsstandard werden auf Eis 1:1 mit Probenpuffer gemischt, anschließend 3 Minuten gekocht. Danach werden alle Proben kurz zentrifugiert, um sie zu sammeln und umgehend auf das Gel aufgetragen.

Gel-Lauf:

Für den Lauf wird das Gel samt Halterung aus der Gießvorrichtung herausgenommen und an die Apparatur geklammert und in die Pufferkammer gesetzt. Obere und untere Pufferkammer werden mit Laufpuffer gefüllt, die Kämmen entfernt, die Gel-Taschen bei Bedarf durch Spülen von Polyacrylamid-Resten gereinigt. Die Apparatur wird auf Dichtheit geprüft und die Proben aufgetragen. Nicht benutzte Gel-Taschen werden mit Probenpuffer gefüllt, um Konzentrationsgradienten innerhalb des Gels zu vermeiden. Der Gel-Lauf findet bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 120 V statt. Sobald die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat, wird das Gel aus der Kammer genommen; es kann nun wie gewünscht weiter verarbeitet werden.

### 2.3.3 Coomassie-Färbung des Proteingels

In einer SDS-PAGE getrennte Polypeptide können mit Coomassie Brilliant Blau in einem Methanol / Essigsäure-Gemisch gleichzeitig gefärbt und fixiert werden. Bei gründlichem Entfärben kann in einer Bande bis zu 0,1 µg Protein detektiert werden.

Materialien:

- Entfärbelösung:
  - 47% Methanol
  - 47% ddH<sub>2</sub>O
  - 6% Essigsäure
- Färbelösung:
  - 0,25 g Coomassie Brilliant Blau R250 werden durch Rühren über Nacht in 190 ml Entfärbelösung gelöst. Vor Gebrauch wird die Färbelösung filtriert.

Geräte:

- Vakuumpumpe
- Gelrockner (Geldryer 583, BioRad)

Arbeitsvorschrift:

Das Gel wird unter Schütteln 30 Minuten bis 4 Stunden in Färbelösung eingelegt und anschließend 8 bis 24 Stunden in Entfärbelösung geschüttelt bis blaue Banden auf transparentem Hintergrund sichtbar sind. Das Bandenmuster wird zur Dokumentation photographiert. Das Gel kann nun entweder in Plastik eingeschweißt gelagert oder getrocknet werden. Zum Trocknen wird das Gel auf einem Filterpapier, bedeckt mit Frischhaltefolie, in den Gelrockner gelegt und dort unter Vakuum 30 bis 60 Minuten bei 85°C getrocknet.

### 2.3.4 Western Blot

Wie beim Northern Blot die RNA werden beim Western Blot (91) Proteine elektrophoretisch getrennt, auf eine Membran übertragen und mit einem

Reagenz beschickt, das es möglich macht, eine spezifische Sequenz (Aminosäuresequenz beim Western Blot, Nukleotid-Sequenz beim Northern Blot) zu detektieren. Hierzu werden beim Western Blot Antikörper verwendet, die spezifisch mit einem antigenen Epitop auf der Membran reagieren. Während Spezifität und Bindungsrate bei der Hybridisierung einer DNA-Sonde im Northern Blot mit Hilfe einer Gleichung relativ leicht vorhergesagt werden können, verhalten sich Antikörper weit weniger berechenbar. Ein Immunglobulin erkennt unter Umständen nur eine bestimmte Konformation eines Epitops (zum Beispiel nur ein natives oder ein denaturiertes), was bedeutet, dass sich nicht alle monoklonalen Antikörper für den Western Blot eignen. Polyklonale Antiseren sind hingegen nicht genau definierte Gemische einzelner Immunglobuline, deren Spezifität, Affinität und Konzentration oft unbekannt sind. Ob ein Antikörper für den Western Blot geeignet ist und wie er eingesetzt werden sollte, muss also für den jeweiligen Antikörper ausprobiert werden (80).

Materialien:

- Nitrozellulose-Membran Protran BA 83, Porengröße 0,2  $\mu\text{M}$   
(Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland):  
Nitrozellulose war das erste Material, das als Träger für Proteine im Western Blot verwendet wurde. Durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen werden Proteine an ihre Oberfläche gebunden. Die Nitrozellulose Membran erwies sich als für die meisten Anwendungen gut geeignet, ist aber sehr empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen. Vor dem Äquilibrieren der Membran in Transferpuffer wird die Nitrozellulose-Membran in ddH<sub>2</sub>O angefeuchtet.
- Transferpuffer:  
3,03 g TRIS Base  
14,4 g Glycin  
350  $\mu\text{l}$  SDS 10 %  
werden nachdem sie mit ddH<sub>2</sub>O auf 900 ml aufgefüllt und gelöst sind 100 ml Methanol zugegeben.
- Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schuell)

Geräte:

- Elektroblobt Apparatur: Mini Trans-Blot (BioRad)
- Stromquelle

Arbeitsvorschrift:

Das Proteingel und die angefeuchteten Membranen werden 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. 2 Blatt Filterpapier werden in Gel-Größe zugeschnitten und, wie die zur Apparatur gehörigen Schwämme, in Transferpuffer angefeuchtet. Der Blot Stapel wird wie folgt zusammengebaut: Auf den zuunterst liegenden Schwamm wird eines der angefeuchteten Filterpapiere gelegt. Darauf werden nacheinander das Gel, die Membran und das zweite Filterpapier platziert. Es ist darauf zu achten, dass alle Luftblasen aus dem Stapel entfernt sind (Verbleiben Luftblasen zwischen Gel und Membran, findet an den entsprechenden Stellen kein Proteintransfer statt.). Der zweite Schwamm bildet den Abschluss. Der vollständige Stapel wird in einem Plastikeinsatz fixiert und aufrecht so in die Elektroblobt-Kammer gesteckt, dass die Membran-Seite des Stapels zur Anode, die Gel-Seite zur Kathode gerichtet ist. Der Transfer der SDS-beladenen Polypeptide findet bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromspannung von 30 Volt über Nacht statt.

Nach dem Blot wird der Stapel abgebaut und die Membran nun entweder sofort geblockt oder in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Will man den Transfer auf Vollständigkeit prüfen, kann das Gel im Anschluss an den Blot mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt werden.

### 2.3.5 In vitro Pull Down Assay

Mit dem In vitro Pull Down Assay soll die Bindung von NHERF und E3KARP an DRA gezeigt werden. An dieser Stelle soll kurz das Prinzip des Experiments erläutert werden: Die PDZ-Adapterproteine werden mittels ihres His-Tag an magnetischen Ni-Agarose Beads immobilisiert. Es folgt die Inkubation mit bakteriellen Lysat von Biotin-C-DRA bzw. Biotin-C-DRA-ETKFminus (-). Nach

mehreren Waschschritten wird das gebundene Material durch Kochen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die elektrophoretisch getrennten Proteine werden im Western-Blot auf eine Membran übertragen und mittels Antikörper gegen DRA bzw. mittels Streptavidin gelabelter Meerrettich-Peroxidase detektiert.

### 2.3.5.1 Immobilisation und Präzipitation

Geräte:

- 12-Tube Magnet Rack

Materialien:

- Interaktionspuffer pH 7,5
  - 200 mM NaCl
  - 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Waschpuffer pH 7,5
  - 200 mM NaCl
  - 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 10 mM Imidazol
- Magnetische Ni-NTA Agarose Beads (Qiagen)
  - 5% Suspension, Bindungskapazität: 300 µg 6-His-tagged Protein/ml

Arbeitsvorschrift:

Alle folgenden Arbeitsschritte werden konsequent bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Es werden jeweils ungefähr 4 µg His-Tag / S-Tag-Fusionsproteine von E3KARP und NHERF und deren Teilkonstrukte in silikonisierte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, in denen sich bereits 1 ml des Interaktionspuffers befindet, um die Imidazol-Konzentration auf unter 15 mM zu senken. Nach Zugabe von 20 µl magnetischen Ni-NTA Agarose Beads (fortan als Beads bezeichnet) wird die Suspension für 1 Stunde bei 4°C auf einem Rotations-Mischer inkubiert. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden in das magnetische Rack gestellt, nach

ungefähr 30-60 Sekunden sind die Beads an der Wand des Eppendorf-Reaktionsgefäß immobilisiert. Der Überstand wird gründlich mit einer Pipette abgesaugt, die Beads für 10 Minuten bei 4°C mit 2% BSA in Interaktionspuffer auf dem Rotations-Mischer geblockt und der Überstand wird erneut mit Hilfe des magnetischen Racks abgesaugt. Nach Zugabe von 500 µl des im pinPointSystem exprimierten Biotin-C-DRA oder Biotin-C-DRA-ETKF- (siehe 2.2.11) werden 500 µl 4 % BSA in Interaktionspuffer zugegeben und für 4 Stunden bei 4°C auf dem Rotations-Mischer inkubiert. Anschließend werden die Beads mit Hilfe des magnetischen Racks 4 mal mit jeweils 750 µl Waschpuffer gewaschen und schließlich in 20 µl Laemmli-Probenpuffer in Lösung gebracht und auf einem SDS-PAGE separiert (siehe 2.3.2) und dann auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (siehe 2.3.4). Um zu kontrollieren, ob die Menge an biotinyliertem C-DRA und C-DRA-ETKF- mit der Menge an tatsächlich vorhandenem C-DRA und C-DRA-ETKF- korreliert, werden 2 Spuren am Rand des selben Gels direkt mit jeweils 10 µl 1:10 verdünntem (in Interaktionspuffer) bakteriellen Lysats plus 10 µl Laemmli-Probenpuffer geladen.

### 2.3.5.2 Nachweis mit Streptavidin-HRP

Streptavidin ist ein 60 kD schweres Protein, aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Es bindet 4 Moleküle Biotin mit hoher Affinität,  $K_p=10^{15} / M$ . Es ist kovalent an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (kommerziell erhältlich), das die Oxidation von Luminol katalysiert und es so in einen angeregten Zustand versetzt. Luminol geht unter Lichtemission in seinen Grundzustand über. Diese Lichtemission kann durch Auflegen eines Films detektiert werden.

Materialien:

- HRP-gekoppeltes Streptavidin (Sigma, Kat-Nr. S2438)
- Tris gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,5:  
150 mM NaCl

20 mM Tris

Nach dem Lösen der Salze wird der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und der Puffer auf sein Endvolumen aufgefüllt.

- Block-Lösung:  
3 % (w/v) BSA (Sigma, Kat-Nr.: A7906-50G) in TBS
- Waschlösung  
0,1 % (w/v) Tween 20 (Sigma) in TBS
- Folienschweißgerät

Arbeitsanweisung:

Um eine unspezifische Bindung des Streptavidin an die Membran zu verhindern wird diese 1 Stunde unter Schütteln in 50 ml Block-Lösung inkubiert. Anschließend wird die Membran 5 Minuten in 50 ml Waschlösung geschüttelt. Die Membran wird in eine Plastiktasche eingeschweißt, wobei eine Seite der Tasche offen bleibt. Das HRP-gekoppelte Streptavidin wird 1 : 10000 in TBS verdünnt und davon 5 ml in die Tasche gegeben, Luftblasen entfernt und die Tasche zugeschweißt. Die Membran wird so unter Schütteln (100 rpm) 1 Stunden inkubiert. Danach wird nicht an das Biotin gebundene Streptavidin entfernt, indem die Membran 3 mal 5 Minuten in 50 ml Wasch-Lösung geschüttelt wird. Schließlich kann die Detektion der Banden mit dem ECL-System zusammen mit dem Blot-Teil, der mit Antikörpern inkubiert wurde (siehe 2.3.5.3) erfolgen.

### 2.3.5.3 Nachweis mit anti-DRA Antikörper

Primärer Antikörper:

- hergestellt von: Elena Schönleber, geb. Lin-Wu, Georg Lamprecht
- Name: AK 2058/4
- gerichtet gegen: C -Terminus von DRA
- hergestellt im: Kaninchen
- Verdünnung: 1 : 1000

Um die Bindung des primären Antikörpers an ein auf der Membran gebundenes Protein nachweisen zu können, wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der gegen Immunglobulin G der jeweiligen Spezies gerichtet ist, in der der Antikörper erzeugt wurde. An den sekundären Antikörper ist ein Enzym, in diesem Fall Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Funktionsweise siehe 2.3.5.2).

Sekundärer Antikörper:

- hergestellt von: Amersham Life Science
- Name: NA 934
- gerichtet gegen: Immunglobulin G des Kaninchens
- hergestellt im: Esel
- Verdünnung: 1 : 5000

Materialien:

- Tris gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,5:  
150 mM NaCl  
20 mM Tris  
Nach dem Lösen der Salze wird der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und der Puffer auf sein Endvolumen aufgefüllt.
- Block-Lösung:  
5 % (w/v) Magermilchpulver (Heirler) in TBS
- Waschlösung  
0,1 % (w/v) Tween 20 (Sigma) in TBS
- Folienschweißgerät

Arbeitsanweisung:

Um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu verhindern, wird diese 1 Stunde unter Schütteln in 50 ml Block-Lösung inkubiert. Der Primärantikörper wird 1 : 1000 in Block-Lösung verdünnt. Die Membran wird nach dem Blocken in eine Plastiktasche eingeschweißt, wobei eine Seite der Tasche offen bleibt. 5 ml der Antikörperverdünnung werden in die Tasche gegeben, Luftblasen entfernt und die Tasche zugeschweißt. Die Membran wird so unter Schütteln

(100 rpm) 4 Stunden inkubiert. Danach werden nicht an das Antigen gebundene Immunglobuline entfernt, indem die Membran 3 mal 5 Minuten in 50 ml Waschlösung geschüttelt wird. Der Sekundärantikörper wird meist 1:5000 in Blocklösung verdünnt. Die Inkubation mit 5 ml der Antikörperverdünnung erfolgt 1 Stunde in einer, wie zuvor beschrieben, hergestellten Plastiktasche unter kräftigem Schütteln (100 rpm). Anschließend wird die Membran in Waschlösung 3 mal 5 Minuten geschüttelt. Nach der damit verbundenen Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers erfolgt die Detektion der Banden mit dem ECL-System zusammen mit dem Blot-Teil, der mit Streptavidin inkubiert wurde (siehe 2.3.5.2), erfolgen.

### 2.3.5.4 Detektion des Signals mit dem ECL-System

Die Detektion der Banden erfolgt mit Hilfe der an den sekundären Antikörper oder der an das Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). HRP und  $H_2O_2$  katalysieren die Oxidation von Luminol (zyklisches Diacylhydracid), das oxidiert in einem angeregten Zustand vorliegt. Angeregtes Luminol geht unter Lichtemission (428 nm) in seinen Grundzustand über (Chemilumineszenz). Die Oxidationsreaktion findet in Anwesenheit von chemischen Verstärkern, wie zum Beispiel Phenol statt (verstärkte Chemilumineszenz), die die Lichtemission um das 100fache erhöhen und die Emissionszeit verlängern. Die Chemilumineszenz erreicht nach 5 bis 20 Minuten ihr Maximum und fällt dann innerhalb von 60 Minuten langsam ab. Zum Zeitpunkt der maximalen Lichtemission werden die Banden durch Auflegen eines gegenüber blauem Licht sensitiven Autoradiographie-Films detektiert.

Materialien:

- Detektions-Reagenz 1 des ECL-Systems (PerkinElmer Life Science)
- Detektions-Reagenz 2 des ECL-Systems (PerkinElmer Life Science)  
Die Zusammensetzung der zum ECL-System gehörenden Reagenzien wird von der Firma nicht angegeben.
- Autoradiographie-Film: Hyperfilm ECL (Amersham Life Science)

- Röntgenkassette (Kodak)

Arbeitsanweisung:

Alle Schritte werden in einem Raum durchgeführt, der vollständig abgedunkelt werden kann und in dem eine Entwickler-Maschine zur Verfügung steht.

Die Detektions-Reagenzien 1 und 2 werden zu gleichen Teilen gemischt, wobei ein Endvolumen von  $0,125 \text{ ml/cm}^2$  benötigt wird. Die Wasch-Lösung wird abgossen und die Membran mit der Protein-Seite nach oben auf eine Plastikfolie gelegt. Die Detektions-Lösung wird so auf der Membran verteilt, dass die Oberflächenspannung die Flüssigkeit auf der Membran-Oberfläche hält. Nach Inkubation von genau einer Minute wird die Detektions-Lösung abgossen und mit Hilfe eines Filterpapiers möglichst gründlich abgesaugt. Die Membran wird in eine aufgeschnittene Plastiktasche gelegt, alle Falten und Luftblasen entfernt, mit der Protein-Seite nach oben in die Röntgenkassette gelegt und das Licht ausgeschaltet. Ein Film wird aufgelegt, die Kassette geschlossen und der Film 5 Sekunden exponiert. Ohne den Film gegen die Membran zu verschieben wird der Film aus der Kassette genommen und entwickelt. Anhand der Intensität der Banden nach der ersten Exposition wird die Expositionszeit abgeschätzt, die benötigt wird, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

### 2.3.6 In vitro Pull Down Assay mit Peptiden

Auch dieses Experiment verfolgt den Nachweis der Bindung von NHERF und E3KARP an DRA. Die Methode unterscheidet sich nur geringfügig von der unter 2.3.5 beschriebenen. Anstelle von bakteriellen Lysaten werden Peptide verwendet, die an ihrem N-Terminus biotinyliert sind. Diese werden durch das Biotin an magnetischen Streptavidin-Beads immobilisiert. Es folgt die Inkubation mit NHERF bzw. E3KARP. Auch hier wird nach mehreren Waschschritten das gebundene Material durch Kochen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die elektrophoretisch getrennten Proteine

werden im Western-Blot auf eine Membran übertragen und mittels Antikörper (Novagen) gegen den S-Tag von NHERF, bzw. E3KARP detektiert.

### 2.3.7 Quantitativer Interaktions-ELISA

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist der mit Abstand am meisten verbreitete immunologische Test im biochemischen und klinisch-chemischen Labor. Er kann in verschiedenen Varianten durchgeführt werden, denen gemeinsam ist, dass die Nachweisreaktion auf der Umsetzung eines chromogenen Substrats durch ein Enzym (z.B. Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase) beruht, das mit dem Antigen oder Antikörper gekoppelt vorliegt.

In diesem Assay, der einem modifizierten Sandwich-ELISA entspricht, werden PDZ-Adapterproteine an Ni-NTA beschichteten ELISA-Platten immobilisiert und dann mit biotinylierten Peptiden oder Fusionsproteinen mit Biotin-Tag inkubiert. An das Biotin der präzipitierten Peptide bzw. Proteine wird eine an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase gebunden, die nach Zugabe der Substratlösung zur Farbentwicklung führt. Die Färbereaktion wird mit einem Platten-Lesegerät ausgelesen. (Abbildung 3.9).

Geräte:

- Platten-Lesegerät MR7000 (Dynatech Laboratories, Billingham, England)
- Mehrkanalpipette-12 (Dunn Labortechnik GmbH; Asbach; Deutschland)

Materialien:

- Ni-NTA HisSorb Plates (Qiagen)
- Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin, Konzentration: 1µg/ml (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, USA)
- TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry):  
Bestehend aus TMB Peroxidase Substrate und Peroxidase Solution B.  
Die beiden Lösungen werden vor Benutzung im Verhältnis 1:1 gemischt.

- Stopplösung  
1 M Phosphorsäure H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2-7,5 (Gibco):  
Der pH-Wert wird durch Zugabe von NaOH auf pH 7,2-7,5 eingestellt
- Wasch-Lösung  
0,1 % (w/v) Tween 20 (Sigma) in PBS
- Block-Lösung  
3 % (w/v) BSA (Sigma) in PBS

Arbeitsanweisung:

Um Proteinabbau zu verhindern wurde das Beladen und Waschen der ELISA-Platten und die Inkubationen auf einem Schüttler bei 4°C im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Weiterhin ist es von Bedeutung, dass die verwendeten Puffer eiskalt sind. Das Vorgehen soll an Hand dieses Schemas verdeutlicht werden:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	0	0,001	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1 pmol
B	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
C	PBS	NHERF										
D	PBS	PDZ1										
E	PBS	PDZ2										
F	PBS	E3KARP										
G	PBS	PDZ1										
H	PBS	PDZ2										

0

Konzentration der Biotin-Tag-Fusionsproteine bzw. der biotinylierten Peptiden Zeile B-H in nmol

→

Die Spalte 1 und Zeile B werden als Negativkontrolle bzw. Background nur mit 100 µl PBS beschickt. Die Zeile A dient zur Bestimmung einer Standardkurve,

hierfür werden die Wells in aufsteigender Konzentrationen (von 0-1 pmol) mit jeweils 100 µl His-S-Biotin-Fusionsprotein beladen. Die Zeilen *C-H* werden ab Reihe 2 jeweils mit 100 µl der zu untersuchenden His-S-Tag-Fusionsproteinen (~1 µM) beschickt. Die Elisa-Platte wird dann mit einer Klebefolie für ELISA-Platten zugeklebt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler im Kühlraum inkubiert. Am folgenden Tag werden alle Wells, außer Zeile *A* (Standardkurve) und Spalte 1 (Negativkontrolle), die mit Klebefolie verschlossen bleiben, jeweils mit 3x 200 µl Waschpuffer gewaschen. Um eine unspezifische Bindung zu verhindern werden diese Wells für 20 Minuten bei 4°C auf dem Schüttler im Kühlraum mit 200 µl Block-Lösung inkubiert. Nach Entfernen der Blocklösung erfolgt eine 4-stündige Inkubation mit den Biotin-Tag-Fusionsproteinen bzw. den biotinylierten Peptiden in aufsteigender Konzentration in den Zeilen *B-H* (grau schattierter Bereich). In Spalte 2 wird mit 0 nmol begonnen, in Spalte 3 5 nmol, dann 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 nmol. Je nach Affinität muss diese Konzentrationsreihe eventuell nach oben oder unten korrigiert werden. Nach Ablauf der 4 Stunden werden alle Wells (auch die bis hierher verklebten) der ELISA-Platte mit 3 x 200 µl Wasch-Lösung gewaschen und dann bei 4°C auf dem Schüttler im Kühlraum mit jeweils 200 µl Block-Lösung inkubiert. Nach Entfernen der Block-Lösung und einer einstündigen Inkubation mit 100 µl Meerretich-Peroxidase pro Well wird die Platte 6 x mit 200 µl Wasch-Lösung pro Well gewaschen.

Das weitere Vorgehen erfolgt bei Raumtemperatur, da nur so eine optimale Umsetzung des Substrates durch die Meerretich-Peroxidase gegeben ist.

Jedem Well werden 100 µl des Peroxidase-Substrat zugegeben. Der Farbumschlag wird bei einer Wellenlänge von 620-650 nm nach 1, 2 und 3 Minuten gemessen. Nach der letzten Messung wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Phosphorsäure gestoppt und bei 450 nm gemessen.

Auswertung:

Um für das nicht lineare Verhältnis von gebundenem Biotin auf der Platte und gemessenem Signal im ELISA zu korrigieren, wurde eine Standardkurve aus den Daten des in Zeile A geladenen His-S-Biotin-Fusionsprotein (0.001 bis 1 pmol) gebildet. Anhand dieser Standardkurve wurden die Messwerte der biotinylierten Peptide in pmol gebundenes Peptid umgerechnet. Durch nicht-lineare Kurvenanpassung wurde aus diesen Daten dann die  $k_m$  anhand der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet (Origin, Microcal).

$$v = v_{\max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Obwohl die „full length“ Konstrukte jeweils zwei PDZ-Domänen besitzen, wurde auch für sie ein Michaelis-Menten-Model mit nur einer Bindungsstelle verwendet, weil sich die Affinitäten der beiden PDZ-Domänen so stark unterscheiden, dass physiologisch wahrscheinlich nur eine Bindung von Bedeutung ist.

Der Vergleich der verschiedenen Phenylalanin-Mutanten erfolgte durch den t-Test (Stat View).

## 3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob der apikale  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher DRA an die PDZ-Adapterproteine E3KARP und/oder NHERF bindet und ob diese Bindung über das vermutete Interaktionsmotiv ETKF zustande kommt. In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, über welche der beiden PDZ-Domänen von E3KARP und NHERF die Bindung erfolgt. Zuletzt sollte gezeigt werden mit welcher Affinität die Bindung erfolgt.

### 3.1 Vorarbeiten

Die Interaktion von DRA mit E3KARP, NHERF und deren einzelner Abschnitte sollte mit rekombinant hergestellten Proteinen untersucht werden. Deshalb mussten vor Beginn der eigentlichen Interaktionsuntersuchungen die jeweiligen Interaktionspartner zunächst exprimiert und aufgereinigt werden.

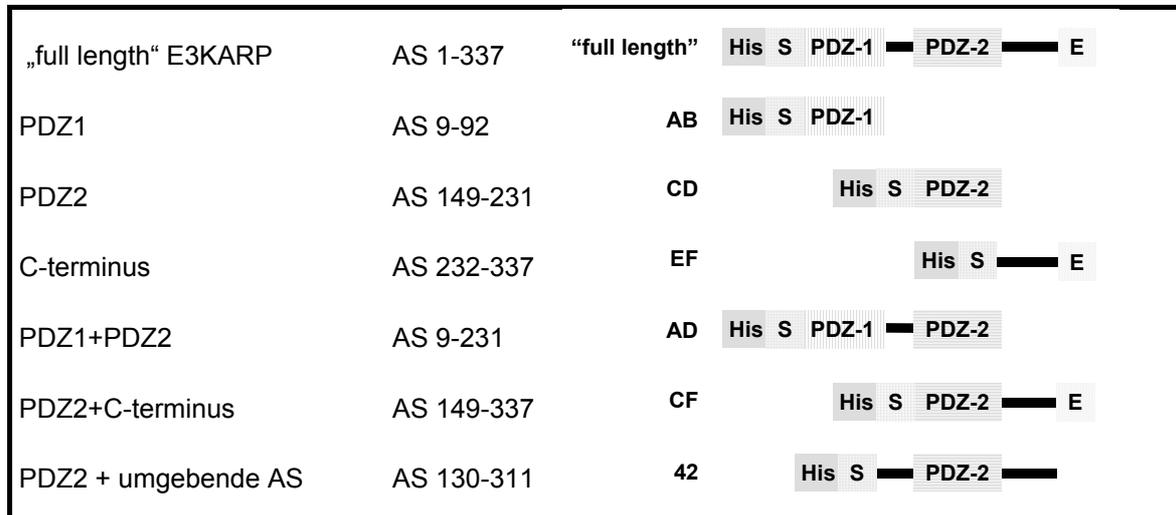
#### 3.1.1 Expression und Aufreinigung der PDZ-Adapterproteine

Die PDZ-Adapterproteine und deren Teilabschnitte waren zu Beginn der Arbeit bereits in das pET30 Vektorsystem kloniert. Sie konnten somit als Hexahistidin-Tag und S-Tag Fusionsproteine in *E. coli* (BL21) exprimiert werden. Die Fusionsproteine wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen mit „Nickel-Nitrilotriacetic Acid (NTA) Resin“, wie vom Hersteller (Qiagen) angegeben, affinitätsgereinigt und anschließend in Elutionspuffer (1 M Imidazol, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 8) aufgenommen. Die Expression wurde mit einem Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gel überprüft (Abbildung 3.11).

Die Quantifizierung der Fusionsproteine erfolgte mittels der Lowry-Methode.

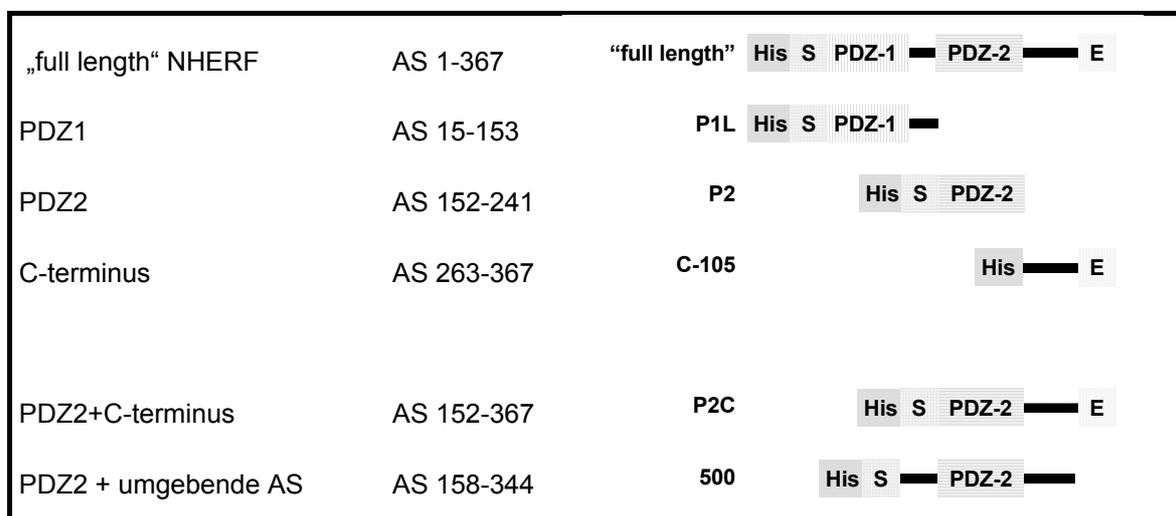
Die unterschiedlichen Expressionslevel wurden in den Interaktionsassays selbstverständlich berücksichtigt.

Zum besseren Verständnis wird an dieser Stelle ein Überblick über die im weiteren Verlauf benutzten PDZ-Adapterproteine und deren Teilabschnitte gegeben.



**Abbildung 3.1: E3KARP und seine Teilabschnitte**

Alle Konstrukte sind als N-terminale His- und S-Tag Fusionsproteine exprimiert. (E = Bindungsstelle für Ezrin)



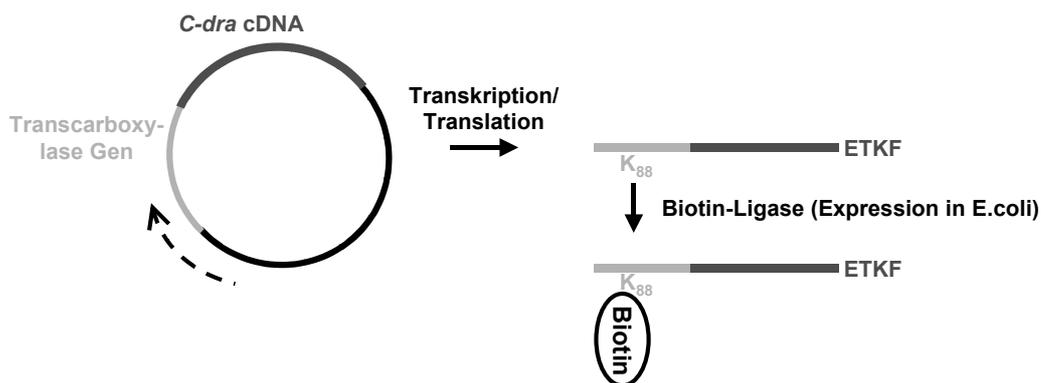
**Abbildung 3.2: NHERF und seine Teilabschnitte**

Alle Konstrukte sind als N-terminale His- und S-Tag Fusionsproteine exprimiert, C105 nur als His-Tag Fusionsprotein. (E = Bindungsstelle für Ezrin)

### 3.1.2 Expression der biotinylierten DRA-Konstrukte

Der intrazellulär gelegene C-Terminus von DRA (C-DRA: AS 567-764) und die Konstrukte, bei denen eine Mutation in den c-terminalen vier Aminosäuren eingefügt wurde (ETKF minus, ETKI, ETKL, ETKV, ETKG, ETKA, ETKFA), waren zum Beginn dieser Arbeit bereits in einem PinPoint Vektorsystem (Promega) vorhanden. Der PinPoint Vektor kodiert für einen N-terminal gelegenen Transcarboxylase-Tag. Dieser wird während der Expression in *E. coli* an Lysin<sub>88</sub> biotinyliert (Abbildung 3.3).

Die *in vivo* Biotinylierung wurde einer chemischen Biotinylierung vorgezogen, da durch diese wahrscheinlich das Lysin an P<sub>-1</sub> im ETKF-Interaktionsmotiv biotinyliert geworden wäre und somit wahrscheinlich die Interaktion mit den PDZ-Adapterproteinen gestört gewesen wäre. Ein weiterer Vorteil der *in vivo* Biotinylierung ist, dass alle Konstrukte gleichermaßen biotinyliert sind. Eine Aufreinigung der biotinylierten Konstrukte durch Verdrängung mittels freiem Biotin war nicht möglich, so dass in den Interaktionsversuchen nach Expression, Sonification und Zentrifugation der Überstand ohne weitere Zwischenschritte verwendet wurde.



**Abbildung 3.3: In vivo Biotinylierung mit dem PinPoint-System**

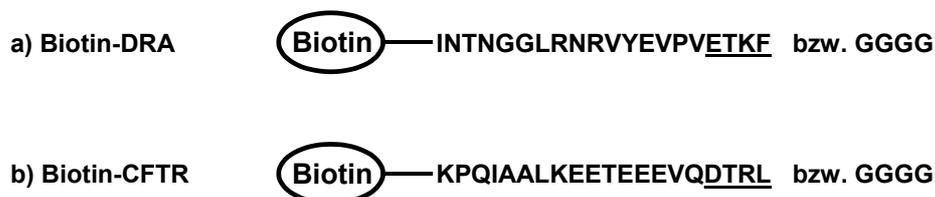
Der PinPoint Vektor exprimiert das c-terminale Ende von DRA (C-DRA) als Transcarboxylase Fusionsprotein. Durch die Biotin-Ligase des *E. coli* wird das Lysin<sub>88</sub> der Transcarboxylase biotinyliert.

### 3.1.3 Biotinylierte DRA- und CFTR-Peptide

Wie oben bereits beschrieben, war es nicht möglich, das in *E.coli* in vivo biotinylierte DRA aufzureinigen. Für die Affinitätsuntersuchungen der Interaktion von DRA mit den PDZ-Adapterproteinen ist es aber unabdingbar, dass DRA in gereinigter Form vorliegt. Des weiteren muss die Menge an verwendetem DRA quantifizierbar sein.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden 20-Aminosäuren lange Peptide, die an ihrem N-terminalen Ende einen Biotin-Tag tragen durch Dr. H. Kalbacher und Mitarbeiter (Arbeitsgruppe Peptidsynthese, Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum) hergestellt. Die Peptide wurden nach Synthese HPLC-gereinigt.

Insgesamt wurden vier Peptide angefertigt. Zum einen das DRA-Peptid mit intaktem Interaktionsmotiv ETKF, zum anderen ein DRA-Peptid bei dem diese vier c-terminalen Aminosäuren durch Glyzine ersetzt wurden. Als Positivkontrolle dient ein CFTR-Peptid, von dem bereits bekannt ist, dass über sein Interaktionsmotiv DTRL eine Bindung an die PDZ-Adapterproteine erfolgt. Für das CFTR-Peptid existiert ebenfalls eine Negativkontrolle, bei der die vier c-terminalen Aminosäuren durch Glyzine ersetzt sind (Abbildung 3.4).

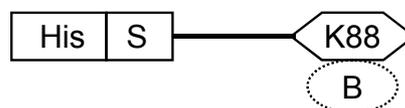


**Abbildung 3.4: 20 Aminosäuren lange biotinylierte Peptide von DRA (a) und CFTR (b)**  
Die Interaktionsmotive *ETKF* von DRA und *DTRL* von CFTR sind jeweils unterstrichen. Für die Negativkontrollen wurden diese vier Aminosäuren durch Glyzine ersetzt. Alle vier Peptide tragen an ihrem N-terminalen Ende einen Biotin-Tag.

### 3.1.4 Das His-S-Biotin-S-Fusionsprotein

Um für das nicht lineare Verhältnis von gebundenem Biotin auf der Platte und gemessenem Signal im ELISA zu korrigieren, muss eine Standardkurve mit einem hierfür angefertigten His-S-Biotin-S-Fusionsprotein erstellt werden.

Hierfür wurde der Transcarboxylase-Tag, über den bei der Expression die Biotinylierung erfolgt, durch Restriktionsverdau über seine EcoRI- und HindIII-Schnittstelle aus dem pinPoint-Vektor „herausgeschnitten“. Parallel dazu wurde der den His- und S-Tag enthaltende pET30b-Vektor mit denselben Enzymen „aufgeschnitten“. In einem weiteren Schritt wurde das Insert, also der Transcarboxylase-Tag in den pET30b-Vektor ligiert. Mit dem so hergestellten Plasmid wurden E. coli TOP10 Zellen transformiert. In der anschließend durchgeführten DNA Mini-Präparation zur Charakterisierung der Transformanten zeigten alle sieben Klone das richtige Insert. Schließlich wurden mit dem Plasmid E. coli BL21 Zellen, in denen die Expression erfolgt, transformiert. Alle Klone haben nach einer Test-Induktion mit IPTG und Kontrolle mittels Western-Blot ein ca. 30 kD großes biotinyliertes Protein exprimiert. Das His-S-Biotin Konstrukt wurde an Ni-Agarose gereinigt, die Quantifizierung erfolgte mit der LOWRY-Methode. Des weiteren wurden auf einem Coomassie Brilliant Blau gefärbten Proteingel zusätzlich zu dem Konstrukt definierte Mengen BSA aufgetragen. Durch Vergleich der BSA-Banden mit der des Konstruktes war eine Abschätzung der Konzentration möglich. Bei einem Molgewicht von 22,181 kD entspricht 1 µg His-S-Biotin-S-Konstrukt 30 pmol.

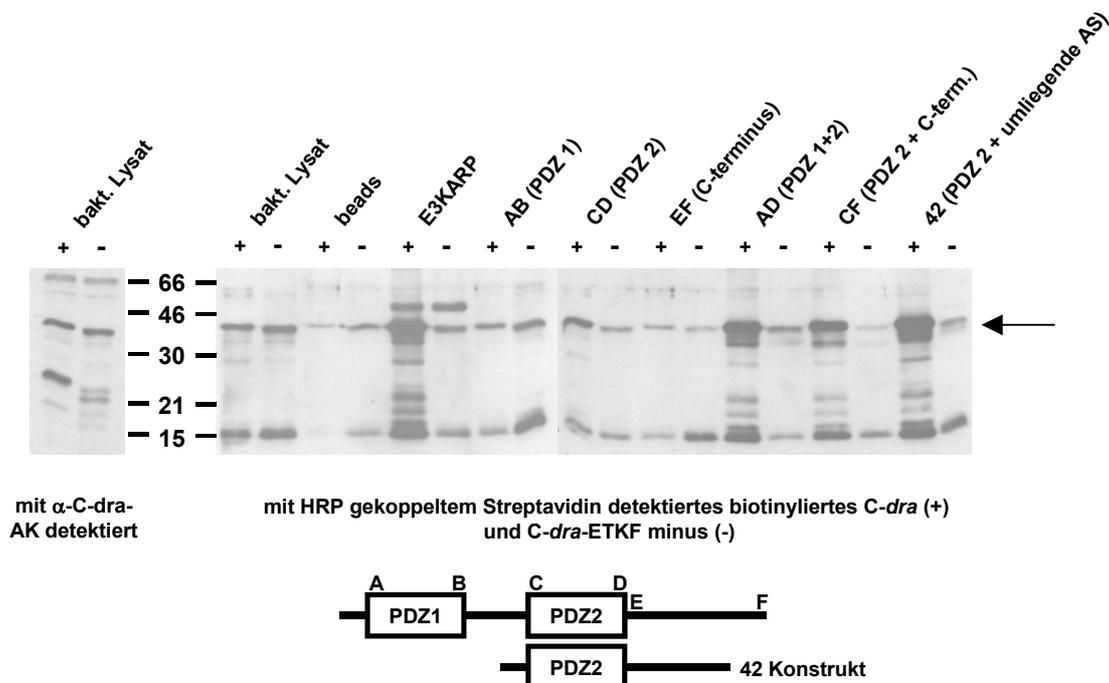


**Abbildung 3.5: His-S-Biotin-S-Fusionsprotein**

His = His-Tag, S = S-Tag, K88 = Lysin des Transcarboxylase-Tag, B = Biotin

### 3.2 Der C-Terminus (ETKF) von DRA ist ein PDZ-Interaktionsmotiv

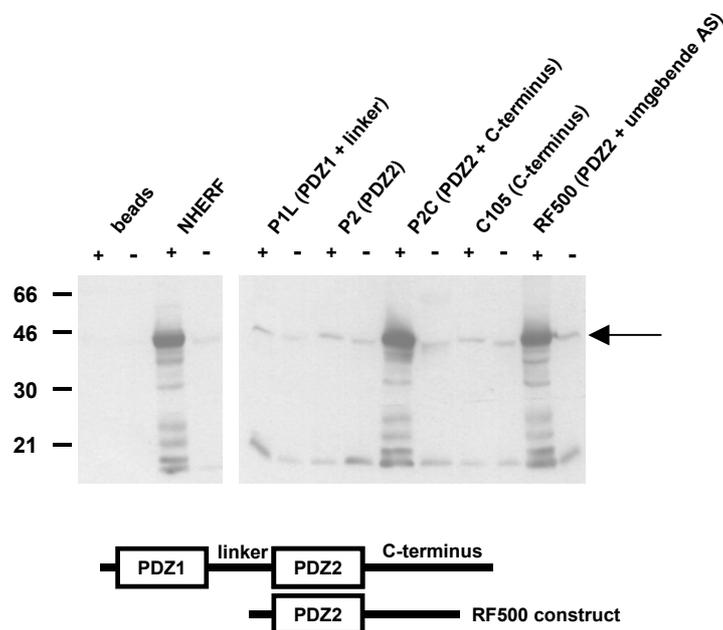
Die Interaktion des C-Terminus von DRA mit den PDZ-Adapterproteinen E3KARP, NHERF und deren Teilbereiche wurde hierfür *in vitro* untersucht. Die PDZ-Adapterproteine und deren Teilkonstrukte wurden über ihren His-Tag an magnetischen Nickel beads immobilisiert. Durch Inkubation mit bakteriellem Lysat wurde getestet, ob die PDZ-Adapterproteine die im Lysat enthaltenen biotinylierten Fusionsproteine des C-Terminus von DRA (C-DRA) bzw. einer Mutante, der das Interaktionsmotiv fehlt (C-DRA-ETKFminus), präzipitieren.



**Abbildung 3.6: Interaktion von E3KARP mit C-DRA (+) und C-DRA-ETKFminus (-).**  
 „Full length“ E3KARP und die 2. PDZ-Domäne binden an C-DRA (+), aber nicht an C-DRA-ETKFminus (-), Banden bei 37 kD (Pfeil). Die verwendeten Konstrukte werden durch das Schema erklärt, so reicht z. B. Konstrukt AD von Punkt A bis D und umfasst somit die 1. und 2. PDZ-Domäne. (n=3)

Das Bindungsverhalten von DRA an E3KARP und dessen Teilabschnitte ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Die Bindung ist durch das Signal bei ca. 37 kD (Pfeil) gekennzeichnet. DRA bindet an „full length“ E3KARP, an das AD-Konstrukt (PDZ1+PDZ2), an das CF-Konstrukt (PDZ2+C-terminus) und an das 42-

Konstrukt (PDZ2+umliegende AS). DRA bindet nicht an diese Konstrukte, wenn ein C-DRA-Konstrukt verwendet wurde, bei dem das c-terminale Interaktionsmotiv *ETKF* von DRA deletiert ist. Es erfolgt keine Bindung von DRA an das AB-Konstrukt (PDZ1), an das CD-Konstrukt (PDZ2 ohne umliegende AS) und an das EF-Konstrukt (C-terminus). Die beads-Spuren zeigen, dass keine unspezifische Bindung des C-DRA an die magnetischen Nickel beads erfolgt. Das bakterielle Lysat in Spur 1 und 2 (rechts des Molekulargewichtsstandard) zeigt, dass gleiche Mengen bakteriellen Lysats auch äquivalente Mengen an biotinyliertem C-DRA bzw. C-DRA-ETKFminus enthalten. Durch Vergleich des Streptavidin-Signals, welches nur biotinyliertes Konstrukt detektiert, mit dem Detektionssignal eines anti-DRA-Antikörpers (Spur 1 und 2 in dem kleinen Western Blot links), wurde ausgeschlossen, dass unbiotinyliertes C-DRA-ETKFminus biotinyliertes aus seiner Bindung verdrängt. Die Banden bei 15 kD sind und unspezifisch und vermutlich durch Abbauprodukte bedingt.



**Abbildung 3.7: Interaktion von NHERF mit C-DRA (+) und C-DRA-ETKFminus (-).**  
 „Full length“ NHERF und die 2. PDZ-Domäne binden an C-DRA, aber nicht an C-DRA-ETKF-, Banden bei 37 kD (Pfeil). Die verwendeten Konstrukte erklären sich auch hier mit Hilfe des Schemas. (n=3)

Das Bindungsverhalten von DRA an NHERF und dessen Teilabschnitte ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Die Bindung ist durch das Signal bei ca. 37 kD (Pfeil) gekennzeichnet. DRA bindet an „full length“ NHERF, an das P2C-Konstrukt (PDZ2 + C-terminus) und das RF500-Konstrukt (PDZ2 + umgebende AS). DRA bindet nicht an diese Konstrukte, wenn ein C-DRA-Konstrukt verwendet wurde, bei dem das c-terminale Interaktionsmotiv *ETKF* von DRA deletiert ist. Es erfolgt keine Bindung von DRA an das P1L-Konstrukt (PDZ1+linker), an das P2-Konstrukt (PDZ2) und an das C105-Konstrukt (C-terminus). Die beads-Spuren zeigen, dass keine unspezifische Bindung des C-DRA an die magnetischen Nickel beads erfolgt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl für E3KARP als auch NHERF gezeigt werden konnte, dass die Interaktion nur mit dem „wild-type“ Konstrukt des DRA C-Terminus erfolgt, hingegen nicht mit dem ETKFminus Konstrukt. Dies zeigt, dass die Interaktion von den vier C-terminalen Aminosäuren von DRA ETKF (Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin) abhängig ist.

Interessanterweise kommt bei beiden Experimenten die Bindung von C-DRA an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF nur zu Stande, wenn diese von nicht zur eigentlichen PDZ-Domäne gehörenden zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren eingefasst ist. Ausschließlich über die PDZ-Domäne alleine findet keine Interaktion statt.

Da ein entsprechendes Konstrukt der 1. PDZ-Domäne mit umgebenden Aminosäuren nicht vorlag, wurde eine solche „lange“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF kloniert, um diese Phänomene weiter zu untersuchen.

### 3.3 Klonierung der „langen“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF

Die neue 1. PDZ-Domäne von E3KARP – AbxL und NHERF – P1LxL wurde durch PCR (*pfu*, Stratagene) hergestellt. Es wurden die unten aufgeführten Primer benutzt (die *EcoRI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen). Die PCR-Ansätze und das Programm für den „Thermo Cycler“ sind an dieser Stelle aufgeführt, da sie speziell für diese PCR optimiert wurden.

#### AbxL (lange 1. PDZ-Domäne von E3KARP)

„forward“ Primer: 5' GAATTCATGGCCGCGCCGGAG 3'

„reverse“ Primer: 5' CTCGAGTCAACTGACATCCTTCTTGCCAGC 3'

Länge PCR-Produkt: 533 bp

PCR-Ansatz:

	Komponenten	Volumen / Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
PCR-Mix:	10x PCR-Puffer	5 µl	1x
	10 mM dNTP-Mix	1 µl	200 µM
	10 µM „forward“ Primer	2 µl	0,4 µM
	10 µM „reverse“ Primer	2 µl	0,4 µM
	Steriles Wasser	38 µl	-
cDNA:	pBS-E3KARP	1 µl	~ 1 ng
Enzym:	<i>pfu</i>	1 µl	2.5 u

#### P1xL (lange 1. PDZ-Domäne von NHERF)

„forward“ Primer: 5' GAATTCATGAGCGCCGACGGGACC 3'

„reverse“ Primer: 5' CTCGAGTCACGGTGGGTTCCTTCTTCCCC 3'

Länge PCR-Produkt: 537 bp

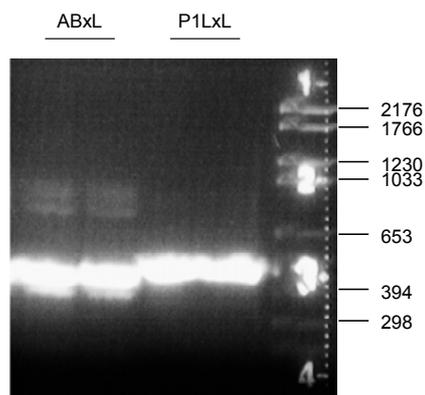
## PCR-Ansatz:

	Komponenten	Volumen / Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
PCR-Mix:	10x PCR-Puffer	5 µl	1x
	10 mM dNTP-Mix	1 µl	200 µM
	10 µM „forward“ Primer	2 µl	0,4 µM
	10 µM „reverse“ Primer	2 µl	0,4 µM
	Steriles Wasser	38 µl	-
cDNA:	pBS-NHERF	1 µl	~ 1 ng
Enzym:	pfu	1 µl	2.5 u

## Programm für den „Thermo-Cycler“:

Denaturieren der cDNA-Matrize zu Beginn:	5 Minuten	94°C
3-Schritt PCR:		
Denaturieren:	45 Sekunden	94°C
„Annealing“:	45 Sekunden	58°C
„Extension“:	1 Minute	72°C
Zahl der Zyklen:	30	
Verlängerung der entstandenen PCR-Produkte am Ende:	10 Minuten	72°C

Ein Aliquot der PCR-Reaktion wurde auf einem 1,6 %igem Agarose-Gel aufgetragen.



**Abbildung 3.8: 1,6 % PCR-Agarose-Gel**  
Gezeigt sind die PCR-Produkte von AbxL (533 bp) und P1LxL (537 bp)

Die Banden in Abbildung 3.8 zeigten die zuvor errechnete Größe. Die DNA konnte somit in den pCR-Blunt II-TOPO® Vektor ligiert werden. Nach

Sequenzierung wurde das Insert mit Hilfe der EcoRI und der XhoI - Schnittstellen in den pET30 subkloniert. Mit diesem Vektor wurden die Konstrukte als Hexahistidin- und S- tag in E. coli (BL21) exprimiert.



**Abbildung 3.9: „neue verlängerte“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP**

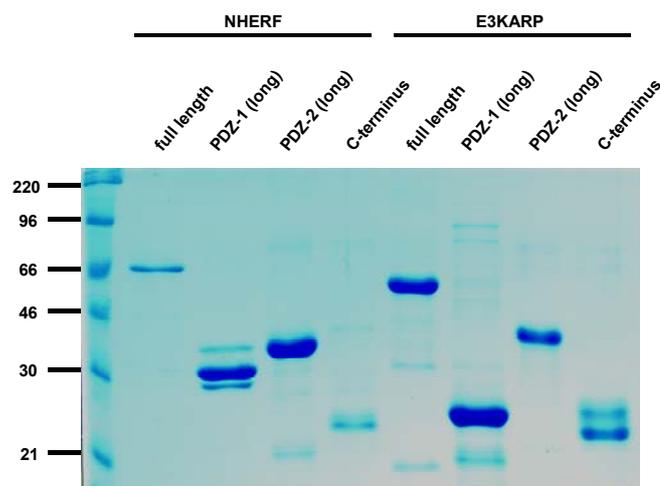
Die PDZ-Domäne ist N- und C-terminal von AS eingefasst.



**Abbildung 3.10: „neue verlängerte“ 1. PDZ-Domäne von NHERF**

Die PDZ-Domäne ist N- und C-terminal von AS eingefasst.

Die „lange“ 1. PDZ-Domäne wurden ebenfalls aufgereinigt und zur Kontrolle und Quantifizierung auf einem Coomassie Brilliant Blau gefärbten Proteingel dargestellt (Abbildung 3.11). Die unterschiedliche Dichte der Banden ist durch die unterschiedliche Konzentration der Proteinlösungen bedingt. Dieser Konzentrationsunterschied wurde in den Interaktionsexperimenten berücksichtigt.

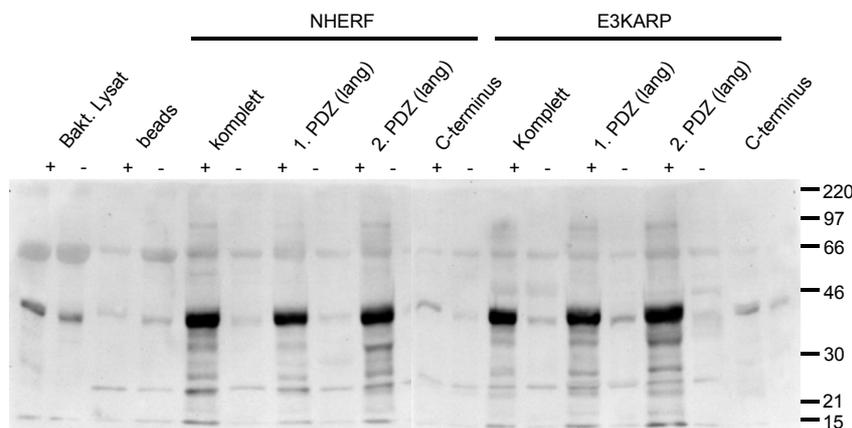


**Abbildung 3.11: Coomassie-Gel der aufgereinigten PDZ-Konstrukte.**

Nach Aufreinigung der PDZ-Konstrukte wurden diese auf einem 12% SDS-PAGE separiert und anschließend mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

### 3.4 Der C-Terminus (ETKF) von DRA bindet an die lange 1. PDZ-Domäne

Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse mit der als Konstrukt mit zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren exprimierten 1. PDZ-Domänen. Das „Wild-type“ C-DRA bindet ebenfalls an die „lange“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF. Die bereits bekannte Bindung von DRA an die „full length“ Konstrukte und an die 2. PDZ-Domäne bestätigt sich in diesem Experiment. Auch hier zeigt sich, dass DRA nicht an diese Konstrukte bindet, wenn ein C-DRA-Konstrukt verwendet wurde, bei dem das c-terminale Interaktionsmotiv *ETKF* von DRA deletiert ist. Das fehlende Signal in den Spuren beads und C-terminus zeigt, dass es sich nicht um eine unspezifische Bindung handelt.

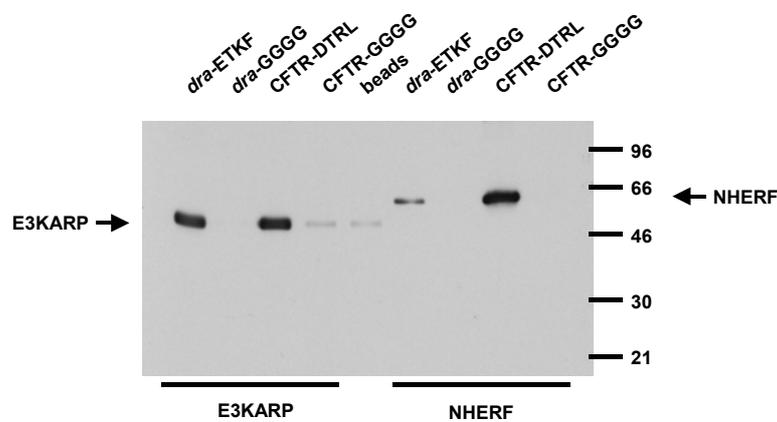


**Abbildung 3.12: Interaktion von NHERF u. E3KARP mit C-dra (+) u. C-dra-ETKFminus(-).** Nach Expression der 1. PDZ-Domäne, als ein Konstrukt mit zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren, bindet das „wild-type“ C-DRA, hingegen nicht die ETKF- Mutante, auch an diese. (n=3)

### 3.5 DRA-Peptid bindet an NHERF und E3KARP

Für das „umgekehrt“ durchgeführte Experiment wurden 20-Aminosäuren-lange C-terminale Peptide von DRA und CFTR, die an ihrem N-terminalen Ende biotinyliert sind, verwendet (siehe dazu auch 3.1.3). Als Negativkontrolle wurden Peptide verwendet, bei denen die Interaktionssequenz ETKF durch 4 Glyzine ersetzt ist.

Es wurde getestet, ob diese Peptide nach Immobilisation an magnetischen Streptavidin beads, gelöstes E3KARP bzw. NHERF, präzipitieren können. Abbildung 3.13 zeigt, dass sowohl das DRA-, als auch das als Positivkontrolle verwendete CFTR-Peptid E3KARP und NHERF präzipitieren. Auffällig ist, dass E3KARP deutlich besser von DRA präzipitiert wird als NHERF. Mit den Peptiden, bei denen die Interaktionssequenz durch Glyzine ersetzt ist, ist keinerlei Präzipitation nachweisbar.



**Abbildung 3.13: Interaktion von Peptid-DRA und CFTR mit E3KARP und NHERF.**  
20-Aminosäuren-lange Peptide von DRA und CFTR präzipitieren E3KARP und NHERF. Keine Präzipitation mit den Peptiden ohne Interaktionsmotiv (GGGG).

### 3.6 Mutation des unkonventionellen Phenylalanin im ETKF-Motiv von DRA

Abbildung 3.13 zeigt, dass E3KARP besser als NHERF durch das DRA Peptid präzipitiert wird. Dies deutet darauf hin, dass es Unterschiede hinsichtlich der Affinität der verschiedenen PDZ-Domänen von E3KARP und NHERF zu DRA und eventuell auch CFTR geben könnte.

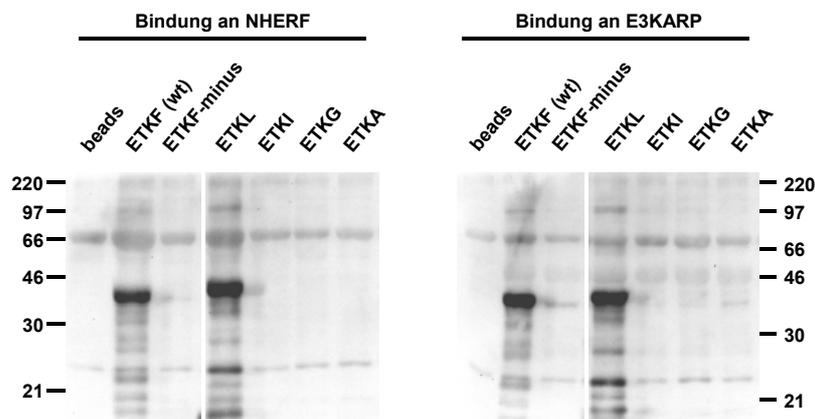
Die in der Einleitung beschriebene Einteilung der PDZ-Domänen bezüglich des Erkennungsmotivs der C-terminalen Residuen in 3 Klassen lässt sich zur folgenden allgemeinen Konsensussequenz zusammenfassen: E/D - S/T - X - L/V (Glutamat/Aspartat - Serin/Threonin - beliebige AS - Leucin/Valin).

Für NHERF wurde in Interaktionsstudien für die 1. PDZ-Domäne *S/T - R/Y - L* (Serin/Threonin - Arginin/Tyrosin - Leucin) und für die 2. PDZ-Domäne *S - S/T - W - L* (Serin - Serin/Threonin - Tryptophan - Leucin) als Konsensussequenz bestimmt (94). Für E3KARP wurden bezüglich möglicher Interaktionsmotive seiner PDZ-Domänen noch keine systematischen experimentellen Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der sehr hohen Homologie der PDZ-Domänen von E3KARP und NHERF in der Aminosäuresequenz (Abbildung 1.2) könnte man vermuten, dass diese auch gleiche oder zumindest ähnliche Interaktionsmotive haben. Dagegen spricht, dass CFTR an die 1. PDZ-Domäne von NHERF (86), aber an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP (90) bindet. Dies lässt darauf schließen, dass in Bezug auf die Bindungseigenschaften doch subtile Unterschiede zwischen den PDZ-Domänen von E3KARP und NHERF existieren könnten.

Das Interaktionsmotiv von DRA stimmt weder mit der für die PDZ-Domänen von NHERF veröffentlichten Konsensussequenz über ein, noch gleicht es der C-terminalen Sequenz von CFTR, die *DTRL* (Aspartat - Threonin - Arginin - Leucin) lautet und an P<sub>0</sub> ebenfalls ein Leucin aufweist.

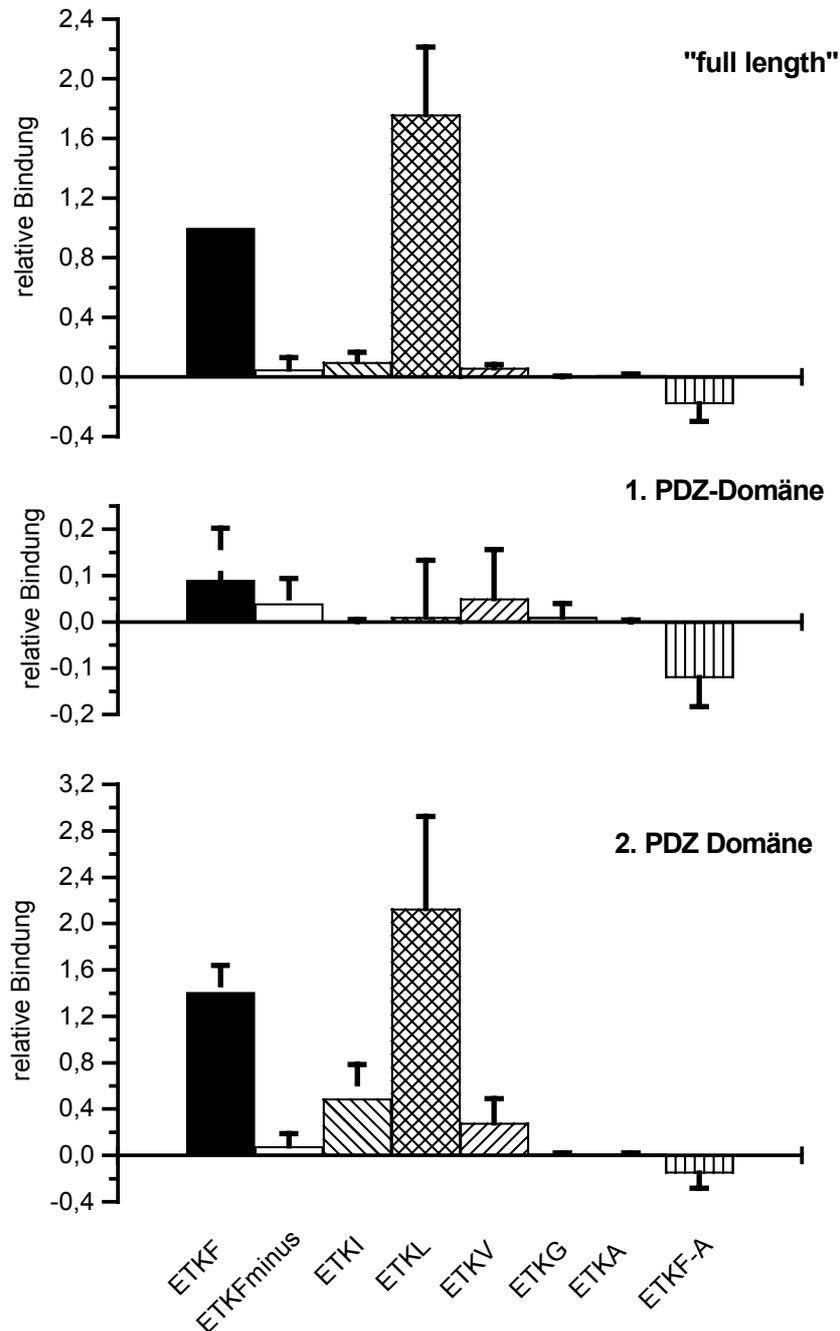
Aus diesem Grund wurde das an P<sub>0</sub> gelegene Phenylalanin im C-terminalen Interaktionsmotiv *ETKF* von *DRA* zu hydrophoben (Leucin, Valin, Isoleucin) und zu neutralen Aminosäuren (Glycin, Alanin) mutiert, außerdem wurde ein zusätzliches Alanin angefügt. Diese Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Bindungs-Eigenschaften an „full length“ E3KARP und NHERF bzw. an deren 1. und 2. PDZ-Domäne sowohl mit der „wild type“ Sequenz, als auch mit dem ETKFminus Konstrukt verglichen. Als Pilotexperiment wurde zunächst ein Interaktionsassay durchgeführt. (Abbildung 3.14). Das *DRA-ETKV-* und das *DRA-ETKFA-*Konstrukt lagen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor. Nach Vorliegen aller Konstrukte wurde die Interaktion mit einem semiquantitativen ELISA untersucht (Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16).

Für den ELISA wurden alle biotinylierten Konstrukte von C-*DRA* („wild type“, *ETKFminus*, *ETKI*, *ETKL*, *ETKV*, *ETKG*, *ETKA*, *ETKF-A*) in derselben Konzentration benutzt (ungefähr 1 µM). Die Menge der tatsächlich an die Platte gebunden PDZ-Domänen Konstrukte wurde über deren S-Tag quantifiziert und die dabei ermittelten kleineren Unterschiede in der Auswertung berücksichtigt.



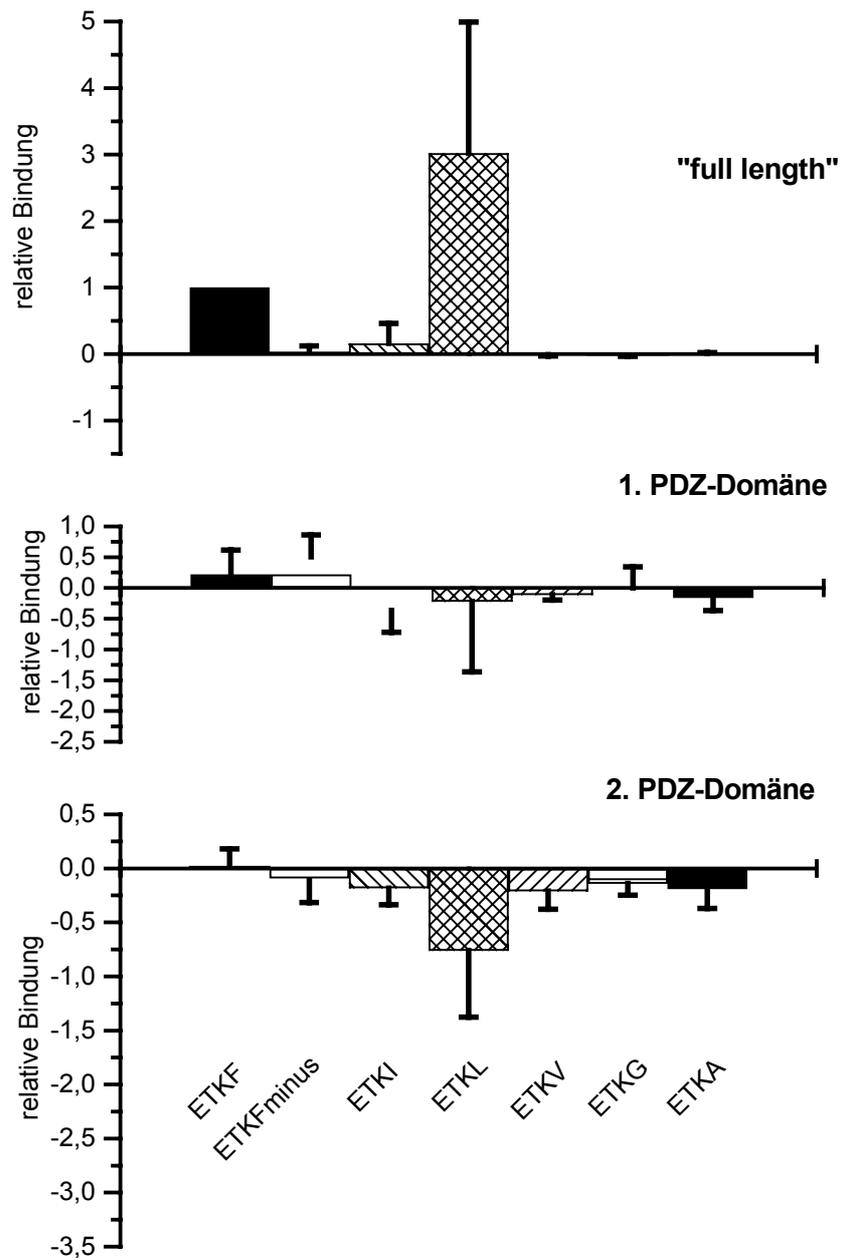
**Abbildung 3.14: Mutation des unkonventionellen Phenylalanin im ETKF-Motiv.**

Interaktionsassay von NHERF und E3KARP mit dem C-Terminus von „wild type“ *DRA* und den Mutanten *ETKFminus*, *ETKL*, *ETKI*, *ETKG*, *ETKA*. Neben dem „wild-type“ bindet nur die *ETKL*-Mutante.



**Abbildung 3.15: Analyse des mutierten Interaktionsmotivs von DRA für E3AKRP.**

Das unkonventionelle C-terminale Phenylalanin wurde durch Isoleucin, Leucin, Valin, Glycin oder Alanin ersetzt. Der Effekt eines zusätzlichen Alanins wurde ebenfalls untersucht. Die Mutationen wurden mit dem „wild Type“ (entspricht relativer Bindung 1) und der Deletionsmutante ETKFminus verglichen: Der C-Terminus ETKF von DRA stellt trotz des ungewöhnlichen Phenylalanins (F) ein spezifisches Interaktionsmotiv für E3KARP dar. Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe der Y-Achsen. (n=4)



**Abbildung 3.16: Analyse des mutierten Interaktionsmotivs von DRA für NHERF.**

Das unkonventionelle C-terminale Phenylalanin wurde durch Isoleucin, Leucin, Valin, Glycin oder Alanin ersetzt. Die Mutationen wurden mit dem „wild Type“ (entspricht relativer Bindung 1) und der Deletionsmutante ETKFminus verglichen. Der C-Terminus ETKF von DRA stellt trotz des ungewöhnlichen Phenylalanins (F) ein spezifisches Interaktionsmotiv für NHERF dar. Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe der Y-Achsen. (n=3)

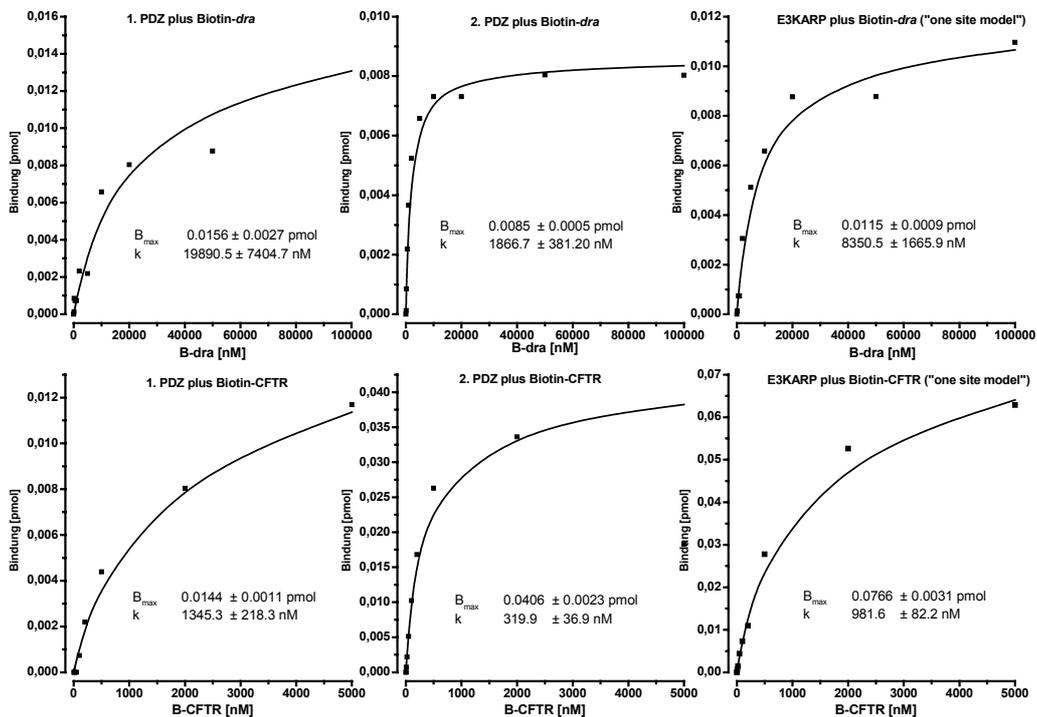
Abbildung 3.15 zeigt, dass das „wild Type“ C-DRA mit hoher Affinität an E3KARP und dessen 2. PDZ-Domäne bindet. Vergleicht man die Bindungsaffinität von E3KARP mit NHERF anhand der Rohdaten der Assays zeigt sich, dass die Bindung von „wild Type“ C-DRA an „full length“ NHERF nur  $17 \pm 4,9$  % ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) beträgt und somit erheblich geringer ist. Dieser Vergleich kann nur anhand der Rohdaten erfolgen, da für die Abbildungen die Bindung von „wild type“ C-DRA an die „full length“ PDZ-Konstrukte auf eingesetzt wurde. Die Bindung von „wild Type“ C-DRA an NHERF konnte weder auf die 1. noch auf die 2. PDZ-Domäne zurückgeführt werden (Abbildung 3.16).

Die Bindungsaffinität der „wild type“ Sequenz wurde nur durch die Substitution von Leucin anstelle des Phenylalanin übertroffen. Das Bindungsmuster an sich wurde dadurch aber nicht beeinflusst. Der Austausch von Phenylalanin durch Valin oder Isoleucin führte zu einer drastischen Reduktion der Bindung. Zur vollständigen Unterbrechung der Bindung mit E3KARP und NHERF bzw. deren 1. und 2. PDZ-Domäne kam es durch Ersatz des Phenylalanin durch die neutralen Aminosäuren Glycin, Alanin oder Anhängen eines zusätzlichen Alanins (nur für E3KARP untersucht). Dasselbe Ergebnis wurde auch durch Deletion des gesamten *ETKF* Motivs erzielt.

Diese Ergebnisse belegen, dass ETKF, trotz des unkonventionellen C-terminalen Phenylalanin, hinsichtlich der Bindung von DRA an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF ein spezifisches PDZ-Interaktionsmotiv ist.

### 3.7 Untersuchung der Bindungsaffinität

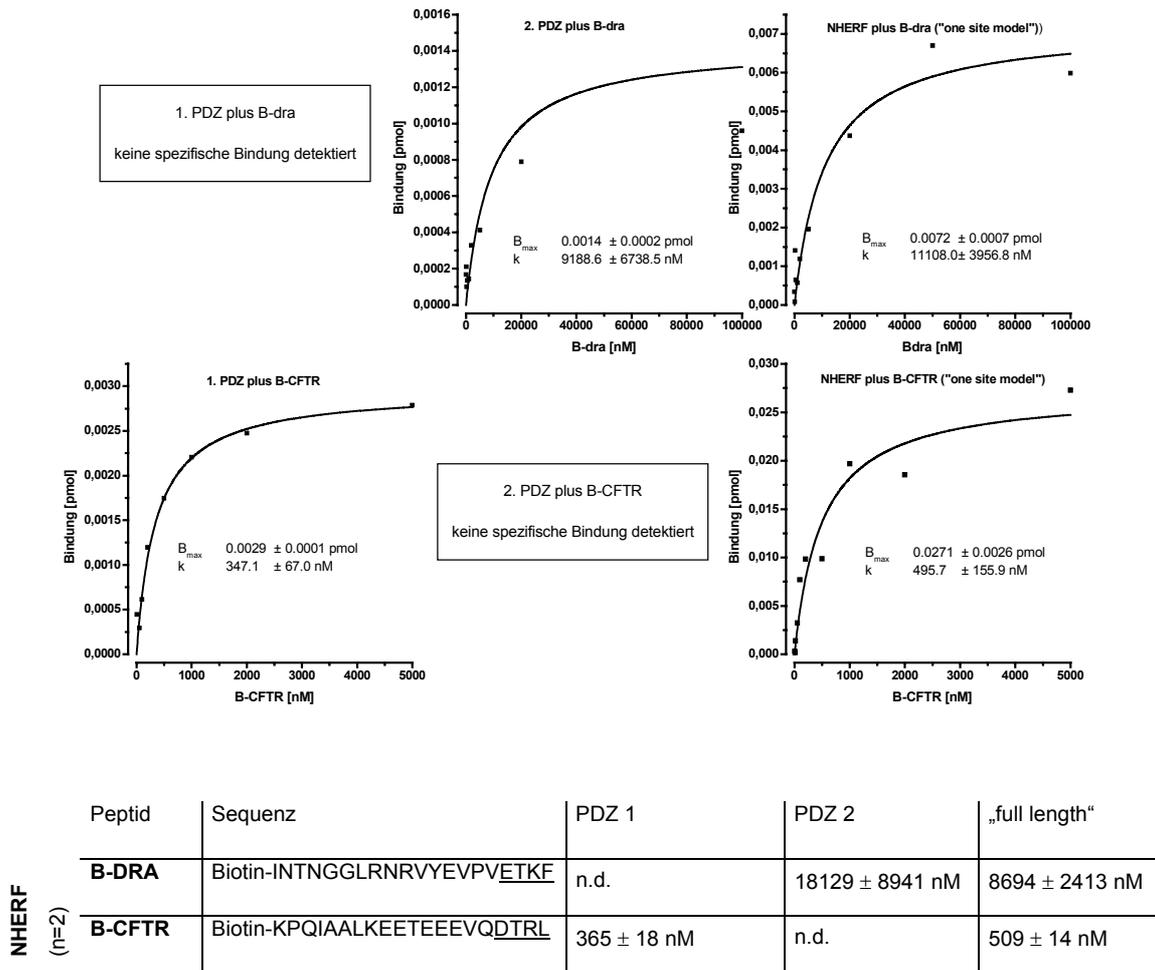
Um die Bindungsaffinität von DRA zu E3KARP und NHERF und deren 1. und 2. PDZ-Domäne besser quantifizieren zu können, wurden steigende Mengen des DRA-Peptid im Interaktions ELISA inkubiert und Sättigungskinetiken ermittelt. Das CFTR-Peptid diente als Positivkontrolle.



E3KARP (n=4)	Peptid	Sequenz	PDZ 1	PDZ 2	„full length“
	B-DRA	Biotin-INTNGGLRNRVYEV <u>PVETKE</u>	$33923 \pm 18733$ nM	$2250 \pm 627$ nM	$9765 \pm 2308$ nM
	B-CFTR	Biotin-KPQIAALKEETEE <u>VQDTRL</u>	$1534 \pm 452$ nM	$289 \pm 27$ nM	$672 \pm 223$ nM

Abbildung 3.17: Affinität von DRA und CFTR zu E3KARP.

Nach der Inkubation mit E3KARP und dessen 1. und 2. PDZ-Domäne wurden ansteigende Konzentrationen der 20-Aminosäuren-langen Peptide von DRA und CFTR eingesetzt. Die jeweilige Affinität ist der Tabelle zu entnehmen. Peptide, bei denen die letzten 4 Aminosäuren zu Glyzinen mutiert waren, haben überhaupt nicht gebunden (Daten sind nicht gezeigt). (Repräsentativ für 4 Experimente)



**Abbildung 3.18: Affinität von DRA und CFTR zu NHERF.**

Nach der Inkubation mit NHERF und dessen 1. und 2. PDZ-Domäne wurden ansteigende Konzentrationen der 20-Aminosäuren-langen Peptide von DRA und CFTR eingesetzt. Die jeweilige Affinität ist der Tabelle zu entnehmen. Peptide, bei denen die letzten 4 Aminosäuren zu Glyzinen mutiert waren, haben überhaupt nicht gebunden (Daten sind nicht gezeigt). (Repräsentativ für 3 Experimente)

Wie erwartet hat das CFTR-Peptid mit hoher Affinität ( $365 \pm 18$  nM) an die 1. PDZ-Domäne von NHERF gebunden aber nicht an die 2. PDZ-Domäne von NHERF. Interessanterweise hat das CFTR-Peptid mit hoher Affinität an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP ( $289 \pm 27$  nM) und mit etwas geringerer Affinität an dessen 1. PDZ-Domäne ( $1534 \pm 452$  nM) gebunden.

Übereinstimmend mit den Daten des semiquantitativen ELISA (siehe 3.6) hat das DRA-Peptid nur an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP mit hoher Affinität ( $2250 \pm 627$  nM) gebunden. Die Affinität zur 1. PDZ-Domäne war deutlich geringer ( $33923 \pm 18733$  nM). Die nach einem „one-site Modell“ ermittelte Affinität für „full length“ E3KARP betrug  $9765 \pm 2308$  nM (Abbildung 3.17).

Für das DRA-Peptid konnte hinsichtlich der Bindung an NHERF für die 1. PDZ-Domäne keine spezifische Bindung ermittelt werden und für die 2. PDZ-Domäne auch eine nur sehr geringe ( $16659 \pm 7591$  nM). Die nach einem „one-site Modell“ ermittelte Affinität für „full length“ NHERF betrug  $12957 \pm 6342$  nM (Abbildung 3.18).

Die Peptide, bei denen die Interaktionssequenzen (*ETKF* bzw. *DTRL*) durch Glyzine mutiert waren, haben an keines der verwendeten Konstrukte gebunden.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen des Interaktions-Experiments, bei dem an Streptavidin-Beads gebundene Peptide verwendet wurden (Abbildung 3.5). Bereits dort war zu erkennen, dass DRA vorzugsweise an E3KARP bindet, während CFTR gleichermaßen an E3KARP und NHERF bindet.

## 4 DISKUSSION

Die elektroneutrale NaCl-Resorption im Darm erfolgt durch funktionelle Kopplung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher NHE3 mit dem Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher DRA. In diesem Rahmen bindet NHE3 an die beiden PDZ-Adapterproteine E3KARP und NHERF, genauer gesagt, jeweils an deren 2. PDZ-Domäne. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch DRA, dessen vier C-terminalen Aminosäuren (*ETKF*) einem PDZ-Interaktionsmotiv ähneln, an eine der PDZ-Domänen von E3KARP oder NHERF bindet, und ob auf diese Weise neben der funktionellen Kopplung auch eine strukturelle Kopplung erfolgt.

### 4.1 Methoden zur Testung der Interaktion von Proteinen

In dieser Arbeit sollte die Interaktion von PDZ-Adapterproteinen und ihren Liganden untersucht werden. An dieser Stelle soll zunächst kurz auf mögliche Methoden eingegangen werden.

- Das Yeast Two-hybrid Verfahren (21) ist ein semiquantitatives, molekularbiologisches Verfahren, mit dem nach neuen bisher unbekannt Interaktionspartnern für ein Protein gesucht werden kann. Die Interaktion muss in einem weiteren Experiment, z.B. einem Pull-Down Assay, bestätigt werden. Yun et al haben mit dieser Methode E3KARP als Interaktionspartner für NHE3 identifiziert (102). Der Nachteil dieses Verfahrens ist der technische Aufwand.
- Gel Overlay Assay mit in vitro transkribierten/translatierten [<sup>35</sup>S]methionin markierten rekombinanten Proteinen: Mit diesem Assay wurde die Interaktion von NHE3 und E3KARP untersucht (101). Mit diesem Verfahren kann die Interaktion bereits bekannter Interaktionspartner untersucht werden oder nach bisher unbekannt möglichen Interaktionspartnern gesucht werden. Nachteilig ist, dass der Umgang mit Radioaktivität erforderlich ist, die Proteine nicht gleichmäßig gelabelt werden, und die Effizienz gering ist. Außerdem ist der Assay relativ teuer.
- Das Surface Plasmon Resonance Verfahren (66) ist eine quantitative Methode, die aber eine spezielles Equipment erfordert und äußerst teuer ist.

Es dient zur Quantifizierung der Bindungsaffinität bereits bekannter Interaktionspartner. Die Arbeitsgruppe um Sharon Milgram untersuchte damit die Interaktion von CFTR mit EBP50 (humanes NHERF) (86).

- Für den Far-Western Assay (7) werden Antikörper gegen die Liganden benötigt. Es handelt sich um eine semiquantitative Methode. Es kann nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern gesucht werden oder eine bereits bekannte Interaktion untersucht werden. Mit dieser Methode wurde die Oligomerisierung von EBP50 untersucht (22).
- Beim Pull Down Assay handelt es sich um eine *in vitro* Methode. Das Protein, das dabei als „Köder“ dient ist dabei entweder mit einem GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) (41) oder einem His-Tag (89) versehen. Das GST-Tag-Fusionsprotein wird an Glutathion-Agarose-beads, das His-Tag-Fusionsprotein an magnetischen Ni-NTA Agarose Beads immobilisiert. Mit dem so immobilisierten Protein kann die Interaktion mit einem weiteren Protein untersucht werden. Für diese Arbeit wurden die Interaktionsuntersuchungen mit His-Tag-Fusionsproteinen und magnetischen Ni-NTA Agarose Beads durchgeführt, da hierbei deutlich weniger Beads benutzt werden können als mit dem GST-Assay. Dies führt zu einer erheblichen Reduktion des Backgrounds.
- Der für diese Arbeit verwendete Interaktions-ELISA wird in Abschnitt 4.4 beschrieben.

#### **4.2 DRA bindet an E3KARP und NHERF**

In dem Interaktionsassay, bei dem magnetischen Ni-Agarose Beads und vergleichsweise große Mengen der PDZ-Adapterproteine und des C-DRA Konstrukts verwendet wurden (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7), sah es zunächst so aus, als ob die Interaktion von DRA mit den Adapterproteinen E3KARP und NHERF ausschließlich über deren 2. PDZ Domäne zu Stande kommt. Wurde eine C-DRA-Mutante verwendet, bei der das Interaktionsmotiv deletiert war, erfolgte keine Bindung.

Auffallend war allerdings, dass diese Bindung nur erfolgte, wenn die 2. PDZ-Domäne von zusätzlichen Aminosäuren eingefasst war. Es erfolgte keine Bindung an die 2. PDZ-Domäne, wenn diese ohne zusätzliche N- und C-terminale Aminosäuren exprimiert war. Dieses Phänomen, dass erst durch zusätzliche Aminosäuren N- und C-terminal der eigentlichen PDZ-Domäne die Bindung eines Interaktionsmotivs möglich wird, wurde auch schon von der Arbeitsgruppe um Kevin Foskett beschrieben (75). Um zu klären, ob die 1. PDZ-Domäne tatsächlich nicht bindet oder es am Fehlen N- und C-terminaler Aminosäuren liegt, wurde eine „lange“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF kloniert, die von zusätzlichen Aminosäuren (siehe 3.3) eingefasst ist.

Mit dem „langen“ Konstrukt der 1. PDZ-Domäne, welches N- und C-terminale Aminosäuren beinhaltet, kam es zur Interaktion mit DRA (Abbildung 3.12). Auch hier kommt es unter Verwendung der C-DRA-ETKFminus-Mutante zur Aufhebung der Bindung.

Hinsichtlich der Methodik des in vitro Pull Down Assay sind folgende Punkte zu bedenken:

Der Assay wurde mit rekombinant hergestelltem biotinyliertem C-DRA durchgeführt, da dies im Gegensatz zum DRA-Peptid deutlich günstiger ist, es der nativen Konformation des C-Terminus entspricht, und aufgrund seiner Masse auf einem Proteingel detektiert werden kann.

Die unterschiedlichen Signale von C-DRA und C-DRA-ETKFminus rühren nicht von ungleicher Biotinylierung her, da gleiche Mengen von bakteriellem Lysat auch vergleichbare Mengen an biotinylierten C-DRA-Konstrukten enthalten (siehe Spur 1 und 2 in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.12).

Theoretisch wäre es auch denkbar, dass im Lysat enthaltenes unbiotinyliertes C-DRA Konstrukt biotinyliertes C-DRA-Konstrukt aus seiner Bindung verdrängt. Durch Vergleich des Streptavidin-Signal, welches nur biotinyliertes Konstrukt detektiert, mit dem Signal eines anti-DRA-Antikörper, der die Konstrukte unabhängig ihrer Biotinylierung erkennt, wurde dieses potentielle Artefakt ausgeschlossen. Egal ob der anti-DRA-Antikörper oder Streptavidin zum

Nachweis benutzt wurden, die Signale des C-DRA und des C-DRA-ETKFminus Konstrukt waren gleich (Abbildung 3.6). Dies lässt darauf schließen, dass Verdrängung durch ein nicht biotinyliertes Konstrukt keine Rolle spielt, beziehungsweise, dass dieses Phänomen im bakteriellen Lysat des „wild type“ Konstruktes in gleichem Maße auftritt wie im Lysat des ETKFminus Konstruktes.

Für diesen Abschnitt lässt sich zusammenfassen, dass das „wild type“ Konstrukt des C-terminus von DRA an NHERF und E3KARP ebenso wie an deren 1. und 2. PDZ-Domäne, aber nicht deren C-terminus bindet. Andererseits erfolgte keine Bindung mit dem ETKFminus Konstrukt. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von den letzten vier C-terminalen Aminosäuren ETKF (Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin) abhängt, und diese Aminosäuren ein PDZ-Interaktionsmotiv darstellen.

#### **4.3 ETKF ist ein spezifisches Interaktionsmotiv**

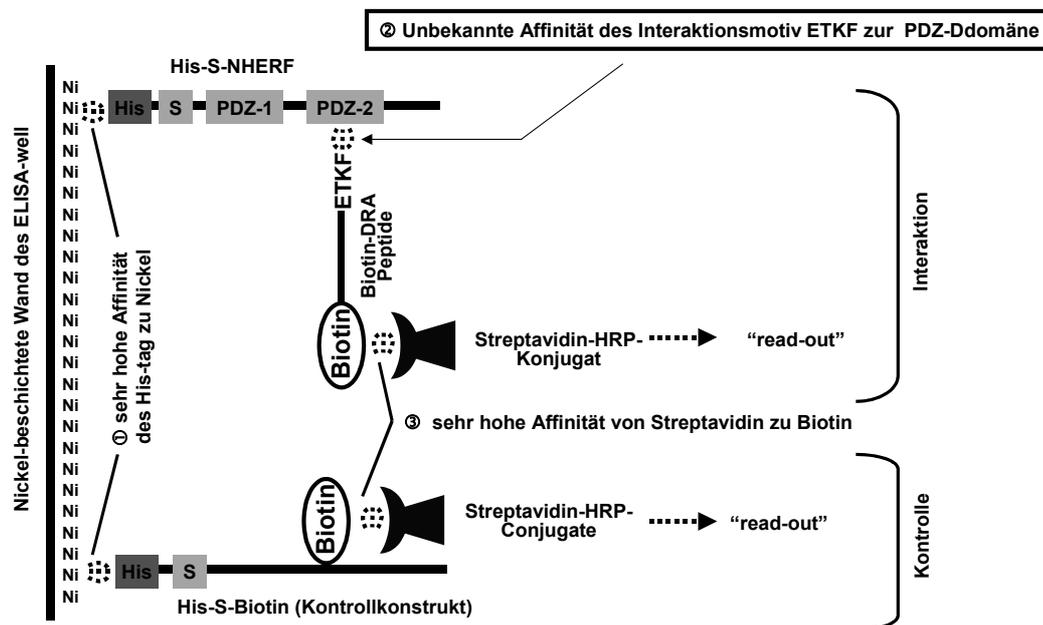
Die Analyse der Daten des Interaktions-ELISA (Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16), in welchem wesentlich weniger Protein verwendet wurde als im Pull Down Assay lässt erkennen, dass die Bindung von DRA an E3KARP nahezu ausschließlich über dessen 2. PDZ-Domäne zustande kommt. Für die Bindung an NHERF sind wahrscheinlich dessen 1. und die 2. PDZ-Domäne nötig. Die Spezifität dieser Bindung wurde durch Substitution des Phenylalanin (F) durch verschiedene Aminosäuren offenbar. Es war nur der Ersatz durch Leucin (L) möglich. Schon der Ersatz durch Isoleucin, bei dem die CH<sub>3</sub>-Gruppe nur ein Kohlenstoffatom weiter verschoben ist, führt zum Verlust der Bindung. Ein weiteres Beispiel aus der Literatur für einen Transporter der am c-terminalen Ende seines PDZ-Interaktionsmotivs (THF) ebenfalls ein Phenylalanin aufweist, ist der GAT3 ( $\gamma$ -Aminobuttersäure-Transporter, Isoform 3) (67).

Die Interpretation dieser Daten zeigt, dass es sich bei der C-terminalen *ETKF* Sequenz von DRA um ein spezifisches PDZ-Interaktionsmotiv handelt.

#### 4.4 Analyse der Bindungsaffinität von DRA an E3KARP und NHERF

Die Arbeitsgruppe um Sharon Milgram, welche sich mit der Interaktion von CFTR mit NHERF beschäftigt, entdeckte, dass CFTR in einem „Overlay-Assay“ an beide PDZ-Domänen von NHERF bindet, und dass es einer sehr viel feineren und differenzierteren Methode (Oberflächenplasmasresonanz) bedarf, um zwischen der hochaffinen Bindung an die erste PDZ-Domäne und der niederaffinen Bindung an die zweite PDZ-Domäne zu unterscheiden (86).

Daraufhin wurde für die vorliegende Arbeit ein ELISA entwickelt, der es erlaubte die Interaktion von DRA mit den PDZ-Domänen von E3KARP und NHERF zu quantifizieren (modifiziert nach (45)). Im Vergleich zur Oberflächenplasmasresonanz ist der ELISA deutlich günstiger und es wird kein spezielles Equipment benötigt.



**Abbildung 4.1: Prinzip des Interaktions-ELISA.**

Rekombinante Fusionsproteine der PDZ-Adapterproteine NHERF bzw. E3KARP werden über ihren His-Tag an das Nickel-beschichtete Well einer ELISA-Platte gebunden. Es folgt die Inkubation mit biotinyliertem Peptid. Über die Streptavidin gekoppelte HRP wird die Menge des gebundenen Peptids gemessen.

In dem ELISA-Well kommt es zu mehreren nicht kovalenten Bindungen: Die PDZ-Adapterproteine binden über ihren His-Tag an die Nickel-beschichtete Wand des ELISA-Wells ①. Biotinyliertes DRA bindet über sein Interaktionsmotiv *ETKF* an das PDZ-Adapterprotein ②. HRP gelabeltes Streptavidin, über das die Quantifizierung erfolgt, bindet an Biotin ③. Da Verbindung ① und ③ äußerst affin und immer gleich sind, wird der „Read-out“ nur durch die Bindung der C-DRA-Konstrukte an die PDZ-Adapterproteine bestimmt. Es kann so indirekt die unbekannt Affinität von Verbindung ② ermittelt werden. (Abbildung 4.1)

Die zuvor für die Interaktionsassays verwendeten biotinylierten Konstrukte des C-terminus von DRA konnten für diesen quantitativen ELISA allerdings nicht benutzt werden, da diese aus dem bakteriellen Lysat weder aufzureinigen waren noch quantifizierbar sind. Anstatt dessen wurden 20-Aminosäuren-lange biotinylierte Peptide des C-Terminus von DRA benutzt.

Für E3KARP zeigte sich, dass DRA mit hoher Affinität ( $2250 \pm 627$  nM) an die 2. PDZ-Domäne gebunden hat. Die Affinität für die 1. PDZ-Domäne war deutlich geringer ( $33923 \pm 18733$  nM). Es ist also davon auszugehen, dass die Bindung an „full length“ E3AKRP über die 2. PDZ-Domäne erfolgt. Die nach einem „one site“ Modell ermittelte Affinität für „full length“ E3KARP beträgt  $9765 \pm 2308$  nM. Für NHERF zeigte sich, dass DRA nicht an die 1. PDZ-Domäne bindet und mit nur geringer Affinität an die 2.PDZ-Domäne ( $18129 \pm 2413$  nM). Die nach einem „one site“ Modell ermittelte Affinität für „full length“ NHERF beträgt  $8694 \pm 2413$  nM.

Bezüglich der Interpretation der Affinitätskonstanten von DRA zu den Adapterproteinen und deren PDZ-Domänen sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen:

- Die Affinität von DRA zu NHERF und dessen PDZ-Domänen ist nur eingeschränkt verwertbar, da es sich bei DRA um ein humanes Protein handelt und NHERF aus dem Opossum stammt. D. Natour, der ebenfalls seine Promotion in unserem Labor durchführt, konnte für das humane

Analogon von NHERF, EBP50 zeigen, dass dies deutlich besser an DRA bindet (68).

- Verglichen mit den Affinitätskonstanten, die mittels Oberflächenplasmaresonanz für CFTR bestimmt wurden (86), ist der ELISA ungefähr um den Faktor 8 weniger sensitiv. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bereits Harris et al (29) darauf hingewiesen haben, dass es äußerst schwierig ist Affinitätskonstanten, die mittels unterschiedlichen Modellen ermittelt wurden, zu vergleichen.
- Aus anderen Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die Verwendung von Peptiden im Rahmen von Affinitätsbestimmungen manchmal zur Unterbewertung führt (6,100).
- Für E3KARP und NHERF wurde gezeigt, dass sie Dimere bilden können (22,56,85). Die Dimerisierung von NHERF wird durch die Bindung von CFTR an seine 1. PDZ-Domäne beeinflusst. Durch die Phosphorylierung von Serin 289, welches C-terminal der 2. PDZ-Domäne liegt, wird die Dimerisierung ebenfalls unterstützt.

Es wäre möglich, dass diese Dimerisierung die Bindungseigenschaften der PDZ-Domänen beeinflusst. Allerdings ist für den ELISA nicht bekannt, ob die Bindung der PDZ-Fusionsproteine an das ELISA-Well, die Dimerisierung behindert oder unterstützt.

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ist davon ausgehen, dass die bestimmte Affinität von DRA zur 2. PDZ-Domäne von E3AKRP und wahrscheinlich auch zu NHERF durchaus physiologisch bedeutsam ist.

#### **4.5 Physiologische Bedeutung und Schlussfolgerung**

Unter Berücksichtigung der seit längerem bekannten funktionellen Kopplung von DRA und NHE3 für die elektroneutrale Absorption von NaCl (51,52) erschien es aus physiologischer Sicht durchaus sinnvoll, dass DRA an E3KARP oder/und NHERF binden könnte. So würde DRA auch strukturell in Verbindung mit NHE3 gebracht werden und damit die funktionelle Kopplung verbessert oder

gar erst ermöglicht werden. Diese Hypothese basiert auf der bereits bekannten Lokalisation von DRA, NHE3, E3KARP und NHERF im Ileum und proximalen Kolon (9,19,39,102).

Allerdings hat keine dieser Studien die direkte Kolo-kalisation dieser Proteine untersucht. Lamprecht et al. zeigten mittels Immunohistochemie an menschlichem Gewebe des proximalen Kolons, dass DRA mit NHE3 und E3AKRP kolokalisiert ist (54). Diese Kolo-kalisation der Proteine in nativem Gewebe ist ein starker Hinweis, dass deren Interaktion, die in der vorliegenden Arbeit in vitro gezeigt wurde, physiologisch bedeutsam ist.

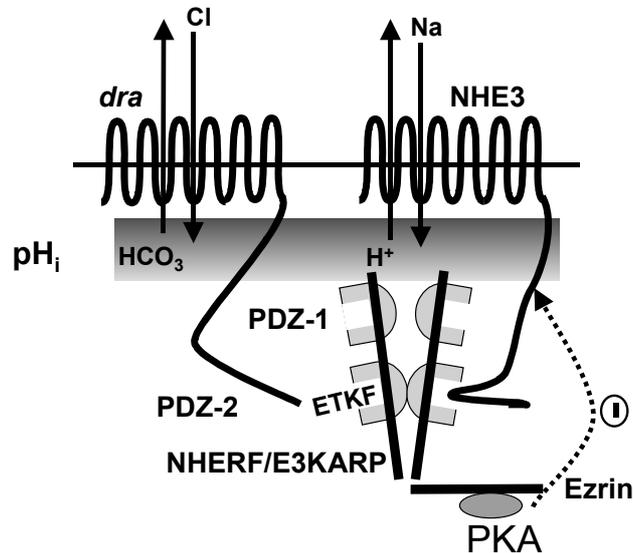
Für Membranproteine, die miteinander in Beziehung stehen oder gar funktionell aneinander gekoppelt sind, wurde in einigen Fällen gezeigt, dass sie an zwei unterschiedliche PDZ-Domänen desselben Proteins binden und somit eine direkte Verknüpfung entsteht. Wiederholt wurde aber auch gezeigt, dass zwei verschieden Transporter an dieselbe PDZ-Domäne eines Adapterproteins binden, und die Kopplung dann mehr indirekt erfolgt (84). Für NHE3 wurde gezeigt, dass es an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP (101) und NHERF (95) bindet. Die Ergebnisse des ELISA zeigen, dass DRA ebenfalls an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP und, auch wenn deutlich schwächer, von NHERF bindet. Dadurch dass für E3KARP und NHERF gezeigt wurde, dass sie dimerisieren können und somit zwei 2. PDZ-Domänen für die Interaktion zur Verfügung stehen (56), ist dennoch eine strukturelle Kopplung der beiden Transporter möglich.

In einem solchen Modell, das in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt ist, wären die folgenden Komponenten in unmittelbarer Nähe vereint:

- DRA und NHE3 – jeweils an die zweite PDZ-Domäne von E3KARP bzw. NHERF gebunden.
- Ezrin – an den C-terminus von E3KARP (101) bzw. NHERF (78) gebunden.
- Proteinkinase A – an Ezrin gebunden (18).

Die cAMP bedingte Stimulation der Protein Kinase A (PKA) führt zur Phosphorylierung und somit zur Inhibition von NHE3 (55,104). Da DRA keine

Phosphorylierungsstellen für die PKA aufweist wird die Transportaktivität von DRA wahrscheinlich indirekt durch Änderung des pH der den Komplex umgebenden intrazellulären Mikrodomäne (51,52) reguliert.



**Abbildung 4.2: Modell zur strukturellen und funktionellen Kopplung von DRA und NHE3**  
Sowohl DRA als auch NHE3 binden an die 2. PDZ-Domäne der Adapterproteine NHERF und E3KARP. Die strukturelle Kopplung kommt über Dimerisierung der 2. PDZ-Domäne der Adapterproteine zustande.

Augenscheinlich ist, dass die 1. PDZ-Domäne der Adapterproteine für weitere interagierende Proteine frei ist. Bisher wurden eine ganze Reihe möglicher Interaktionspartner beschrieben, so z. B. der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor (27), der PDGF Rezeptor (62) oder die G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase 6A (28). Reczek et al. entdeckten kürzlich ein in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen vorkommendes Protein: EPI64 (EBP50-PDZ Interactor of 64 kD). Es bindet an die 1. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF/EBP50 (79). Interessanterweise weist EPI64 eine ungefähr 200-Aminosäuren-lange TBC/rabGAP Domäne auf, welche für die Fusion von Vesikeln mit der apikalen Membran bedeutsam ist. EPI64 könnte so in Zusammenarbeit mit E3KARP bzw. NHERF eine Rolle beim Ein- und Ausbau der Transportkomplexe in die apikale Plasmamembran spielen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die elektroneutrale NaCl Absorption im Darm erfolgt durch parallelen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austausch in der apikalen Membran des Enterozyten. Die daran beteiligten Ionenporter sind der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher 3 (NHE3) und das Genprodukt von „down regulated in adenoma“ (DRA). Für die cAMP vermittelte Inhibition des NHE3 ist es erforderlich, dass der Transporter an die 2. PDZ-Domäne (PSD 95, disk large, ZO1) der Adapterproteine „NHE3 kinase A regulatory protein“ (E3KARP) oder „NHE3 regulatory factor“ (NHERF) bindet.

Da die vier C-terminalen Aminosäuren des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers DRA, *ETKF* (Glutamat - Threonin - Lysin - Phenylalanin) einem PDZ-Interaktionsmotiv ähneln, wurde hier untersucht, ob DRA ebenfalls an eine der PDZ-Domänen von E3KARP oder NHERF bindet.

DRA bindet in vitro an die 2. PDZ-Domäne von E3KARP und NHERF. Das C-terminale Phenylalanin, welches für ein PDZ-Interaktionsmotiv ungewöhnlich ist, kann nur durch Leucin substituiert werden, aber beispielsweise nicht durch andere hydrophobe Aminosäuren (Valin oder Isoleucin).

Mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten wird ein Modell aufgestellt, indem NHE3 und DRA jeweils an die 2. PDZ-Domäne der Adapterproteine binden. Durch eine Dimerisierung von E3KARP bzw. NHERF kann so, neben der bereits bekannten funktionellen, auch eine strukturelle Kopplung erfolgen. In diesem Modell würde die Transportaktivität von DRA indirekt durch Änderung des pH der den Komplex umgebenden intrazellulären Mikrodomäne an die Transportaktivität von NHE3 angepasst und so gemeinsam mit NHE3 reguliert werden.

In diesem Modell würde die 1. PDZ-Domäne von E3KARP bzw. NHERF frei bleiben, zum Beispiel für die Interaktion mit Proteinen, die der Signaltransduktion dienen.

## 6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Computergestützte Vorhersage der Sekundärstruktur von DRA.....	7
Abbildung 1.2:	Vergleich der Aminosäuresequenz von E3KARP und NHERF.....	11
Abbildung 1.3:	Struktur einer PDZ-Domäne, Mechanismen der Peptiderkennung.....	13
Abbildung 1.4:	Organisation und Regulation des NHE3.....	15
Abbildung 1.5:	Schema zur strukturellen Kopplung von DRA und NHE3.....	16
Abbildung 2.1:	pCR-BLUNT II- TOPO <sup>®</sup> -Vektor (Invitrogen).....	26
Abbildung 2.2:	Die pET-30a-c(+) Vektorgruppe (Novagen).....	27
Abbildung 3.1:	E3KARP und seine Teilabschnitte.....	66
Abbildung 3.2:	NHERF und seine Teilabschnitte.....	66
Abbildung 3.3:	In vivo Biotinylierung mit dem PinPoint-System.....	67
Abbildung 3.4:	20 Aminosäuren lange biotinylierte Peptide von DRA (a) und CFTR (b).....	68
Abbildung 3.5:	His-S-Biotin-S-Fusionsprotein.....	69
Abbildung 3.6:	Interaktion von E3KARP mit C-DRA (+) und C-DRA- ETKFminus (-).....	70
Abbildung 3.7:	Interaktion von NHERF mit C-DRA (+) und C-DRA- ETKFminus (-).....	71
Abbildung 3.8:	1,6 % PCR-Agarose-Gel.....	74
Abbildung 3.9:	„neue verlängerte“ 1. PDZ-Domäne von E3KARP.....	75
Abbildung 3.10:	„neue verlängerte“ 1. PDZ-Domäne von NHERF.....	75
Abbildung 3.11:	Coomassie-Gel der aufgereinigten PDZ-Konstrukte.....	75
Abbildung 3.12:	Interaktion von NHERF u. E3KARP mit C-dra (+) u. C-dra- ETKFminus(-).....	76
Abbildung 3.13:	Interaktion von Peptid-DRA und CFTR mit E3KARP und NHERF.....	77
Abbildung 3.14:	Mutation des unkonventionellen Phenylalanin im ETKF- Motiv.....	79

Abbildung 3.15: Analyse des mutierten Interaktionsmotivs von DRA für  
E3AKRP ..... 80

Abbildung 3.16: Analyse des mutierten Interaktionsmotivs von DRA für  
NHERF ..... 81

Abbildung 3.17: Affinität von DRA und CFTR zu E3KARP ..... 83

Abbildung 3.18: Affinität von DRA und CFTR zu NHERF. .... 84

Abbildung 4.1: Prinzip des Interaktions-ELISA ..... 90

Abbildung 4.2: Modell zur strukturellen und funktionellen Kopplung von DRA  
und NHE3 ..... 94

## 7 LITERATURVERZEICHNISS

1. Aichbichler, B. W., Zerr, C. H., Santa Ana, C. A., Porter, J. L. und Fordtran, J. S.: Proton-Pump Inhibition of Gastric Chloride Secretion in Congenital Chloridorrhea. *N Engl J Med*, 336: 106-109, 1997.
2. Alper, S. L., Rossmann, H., Wilhelm, S., Stuart-Tilley, A. K., Shmukler, B. E. und Seidler, U.: Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 277: G321-G332, 1999.
3. Aronson, P. S., Soleimani, M. und Grassl, S. M.: Properties of the renal  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransporter. *Semin Nephrol*, 11: 28-36, 1991.
4. Bertrand, C. und Frizzell R.A.: The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol*, 285: C1-C18, 2003.
5. Birnboim H.C. und Doly J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-23, 1979.
6. Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W. und Bredt, D. S.: Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci*, 16: 7407-7415, 1996.
7. Burgess, R. R., Arthur, T. M. und Pietz, B. C.: Mapping protein-protein interaction domains using ordered fragment ladder far-Western analysis of hexahistidine-tagged fusion proteins. *Methods Enzymol*, 328: 141-157, 2000.
8. Byeon, M. K., Frankel, A., Papas, T. S., Henderson, K. W. und Schweinfest, C. W.: Human DRA functions as a sulfate transporter in Sf9 insect cells. *Protein Expr Purif*, 12: 67-74, 1998.
9. Byeon, M. K., Westerman, M. A., Maroulakou, I. G., Henderson, K. W., Suster, S., Zhang, X.K., Papas, T.S., Vesely, J., Willingham, M. C., Green, J. E. und Schweinfest, C. W.: The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene*, 12: 387-396, 1996.
10. Cho, K. O., Hunt, C. A. und Kennedy, M. B.: The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, 9: 929-942, 1992.
11. Chow, A., Dobbins, J. W., Aronson, P. S. und Igarashi, P.: cDNA cloning and localization of a band 3-related protein from ileum. *Am J Physiol*, 263: G345-52, 1992.

12. Darrow, D.: Congenital alkalosis with diarrhoea. *J Pediatr*, 26: 519-532, 1945.
13. Devroede, G.J. und Phillips, S.F.: Conservation of sodium, chloride, and water by the human colon. *Gastroenterology*, 56: 101-9, 1969.
14. Donowitz, M., Janecki, A., Akhter, S., Cavet, M. E., Sanchez, F., Lamprecht, G., Zizak, M., Kwon, W. L., Khurana, S., Yun, C. H. und Tse, C. M.: Short-term regulation of NHE3 by EGF and protein kinase C but not protein kinase A involves vesicle trafficking in epithelial cells and fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 915: 30-42, 2000.
15. Donowitz, M., Montgomery, J. L., Walker, M. S. und Cohen, M. E.: Brush-border tyrosine phosphorylation stimulates ileal neutral NaCl absorption and brush-border Na(+)-H+ exchange. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 266: G647-G656, 1994.
16. Donowitz, M. und Welsh, M. J.: Ca<sup>2+</sup> and Cyclic AMP in Regulation of Intestinal Na, K, and CL Transport. *Annu Rev Physiol*, 48: 135-150, 1986.
17. Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. und MacKinnon, R.: Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell*, 85: 1067-1076, 1996.
18. Dransfield, D. T., Bradford, A. J., Smith, J., Martin, M., Roy, C., Mangeat, P. H. und Goldenring, J. R.: Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *EMBO J*, 16: 35-43, 1997.
19. Dudeja, P. K., Rao, D. D., Syed, I., Joshi, V., Dahdal, R. Y., Gardner, C., Risk, M. C., Schmidt, L., Bavishi, D., Kim, K. E., Harig, J. M., Goldstein, J. L., Layden, T. J. und Ramaswamy, K.: Intestinal distribution of human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms NHE-1, NHE-2, and NHE-3 mRNA. *Am J Physiol*, 271: G483-G493, 1996.
20. Faux, M. C. und Scott, J. D.: Molecular glue: kinase anchoring and scaffold proteins. *Cell*, 85: 9-12, 1996.
21. Fields, S. und Song, O.: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-246, 1989.
22. Fouassier, L., Yun, C. C., Fitz, J. G. und Doctor, R. B.: Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J Biol Chem* 2000, 275: 25039-25045, 2000.
23. Gamble, J.L., Fahey, K.R., Appelton, J. und McLachlan, E.: Congenital alkalosis with diarrhoea. *J Pediatr*, 26: 509-518, 1945.

24. Goss, G. G., Woodside, M., Wakabayashi, S., Pouyssegur, J., Waddell, T., Downey, G. P. und Grinstein, S.: ATP dependence of NHE-1, the ubiquitous isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Analysis of phosphorylation and subcellular localization. *J Biol Chem*, 269: 8741-8748, 1994.
25. Greeley, T., Shumaker, H., Wang, Z., Schweinfest, C. W. und Soleimani, M.: Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281: G1301-G1308, 2001.
26. Haila, S., Saarialho-Kere, U., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Lohi, H., Airola, K., Holmberg, C., Hastbacka, J., Kere, J. und Hoglund, P.: The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem Cell Biol*, 113: 279-286, 2000.
27. Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J. und Lefkowitz, R. J.: A C-terminal motif found in the beta 2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *PNAS*, 95: 8496-8501, 1998.
28. Hall, R. A., Spurney, R. F., Premont, R. T., Rahman, N., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A. und Lefkowitz, R. J.: G Protein-coupled Receptor Kinase 6A Phosphorylates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor via a PDZ Domain-mediated Interaction. *J Biol Chem*, 274: 24328-24334, 1999.
29. Harris, B. Z. und Lim, W. A.: Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci*, 114: 3219-3231, 2001.
30. Harrison, S. C.: Peptide-Surface Association: The Case of PDZ and PTB Domains. *Cell*, 86: 341-343, 1996.
31. Hoglund, P., Auranen, M., Socha, J., Popinska, K., Nazer, H., Rajaram, U., Holmberg, C., de la Chapelle, A. und Kere, J.: Genetic background of congenital chloride diarrhea in high-incidence populations: Finland, Poland, and Saudi Arabia and Kuwait. *Am J Hum Genet*, 63: 760-768, 1998.
32. Hoglund, P., Haila, S., Gustavson, K. H., Taipale, M., Hannula, K., Popinska, K., Holmberg, C., Socha, J., de la Chapelle, A. und Kere, J.: Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum Mutat*, 11: 321-327, 1998.
33. Hoglund, P., Haila, S., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Green, E. D., Weissenbach, J., Holmberg, C., de la Chapelle, A. und Kere, J.: Positional candidate genes for congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res*, 6: 202-210, 1996.

34. Hoglund, P., Haila, S., Socha, J., Tomaszewski, L., Saarialho-Kere, U., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Airola, K., Holmberg, C., de la Chapelle, A. und Kere: Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat Genet*, 14: 316-319, 1996.
35. Holmberg, C.: Congenital chloride diarrhoea. *Clin Gastroenterol*, 15: 583-602, 1986.
36. Holmberg, C., Perheentupa, J., Launiala, K. und Hallman, N.: Congenital chloride diarrhoea. Clinical analysis of 21 Finnish patients. *Arch Dis Child*, 52: 255-267, 2004.
37. Holmberg, C., Perheentupa, J. und Pasternack A.: The renal lesion in congenital chloride diarrhea. *J Pediatr*, 91: 738-743, 1977.
38. Holmberg, C., Perheentupa, J. und Launiala, K.: Colonic electrolyte transport in health and in congenital chloride diarrhea. *J Clin Invest*, 56: 302-310, 1975.
39. Hoogerwerf, W. A., Tsao, S. C., Devuyst, O., Levine, S. A., Yun, C. H. C., Yip, J. W., Cohen, ME, Wilson, P. D., Lazenby, A. J., Tse, C. M. und Donowitz, M.: NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol*, 270: G29-G41, 1996.
40. Jacob, P., Rossmann, H., Lamprecht, G., Kretz, A., Neff, C., Lin Wu, E., Gregor, M., Groneberg, D. A., Kere, J. und Seidler, U.: Down-regulated in adenoma mediates apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*, 122: 709-724, 2002.
41. Kaelin, W.G. Jr, Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F.J. und Livingston, D.M.: Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*, 64: 521-32, 1991.
42. Kapus, A., Grinstein, S., Wasan, S., Kandasamy, R. und Orlowski, J.: Functional characterization of three isoforms of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem*, 269: 23544-23552, 1994.
43. Karthikeyan, S., Leung, T. und Ldias, J. A. A.: Structural Basis of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Regulatory Factor PDZ1 Interaction with the Carboxyl-terminal Region of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J Biol Chem*, 276: 19683-19686, 2001.
44. Karthikeyan, S., Leung, T. und Ldias, J. A. A.: Structural Determinants of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Regulatory Factor Interaction with the beta 2 Adrenergic and Platelet-derived Growth Factor Receptors. *J Biol Chem*, 277: 18973-18978, 2002.

45. Kashishian, A., Howard, M., Loh, C., Gallatin, W. M., Hoekstra, M. F. und Lai, Y.: AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J Biol Chem*, 273: 27412-27419, 1998.
46. Kere, J., Lohi, H. und Hoglund, P.: Genetic Disorders of Membrane Transport III. Congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*, 276: G7-G13, 1999.
47. Kere, J., Sistonen, P., Holmberg, C. und de-la, C. A.: The gene for congenital chloride diarrhea maps close to but is distinct from the gene for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10686-10689, 1993.
48. Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N. und Sheng, M.: Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*, 378: 85-88, 1995.
49. Kim, J. H., Lee-Kwon, W., Park, J. B., Ryu, S. H., Yun, C. H. C. und Donowitz, M.: Ca<sup>2+</sup>-dependent Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 3 (NHE3) Requires an NHE3-E3KARP- $\alpha$ -Actinin-4 Complex for Oligomerization and Endocytosis. *J Biol Chem*, 277: 23714-23724, 2002.
50. Kirkinen, P. und Jouppila, P.: Prenatal ultrasonic findings in congenital chloride diarrhoea. *Prenat Diagn*, 4: 457-461, 2004.
51. Knickelbein, R., Aronson, P. S., Atherton, W. und Dobbins, J. W.: Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am J Physiol*, 245: G504-10, 1983.
52. Knickelbein, R., Aronson, P. S., Schron, C. M., Seifter, J. und Dobbins, J. W.: Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO<sub>3</sub> exchange and mechanism of coupling. *Am J Physiol*, 249: G236-45, 1985.
53. Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. und Seeburg, P. H.: Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269: 1737-1740, 1995.
54. Lamprecht, G., Heil, A., Baisch, S., Lin-Wu, E., Yun, C. C., Kalbacher, H., Gregor, M. und Seidler, U.: The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Biochemistry*, 41: 12336-12342, 2002.
55. Lamprecht, G., Weinman, E. J. und Yun, C. H.: The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J Biol Chem*, 273: 29972-29978, 1998.
56. Lau, A. G. und Hall, R. A.: Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor

- carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry*, 40: 8572-8580, 2001.
57. Levine, S. A., Montrose, M. H., Tse, C. M. und Donowitz, M.: Kinetics and regulation of three cloned mammalian  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J Biol Chem*, 268: 25527-25535, 1993.
  58. Lubcke, R., Haag, K., Berger, E., Knauf, H. und Gerok, W.: Ion transport in rat proximal colon in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 251: G132-G139, 1986.
  59. Mahajan, R.J., Baldwin, M.L., Harig, J.M., Ramaswamy, K. und Dudeja, P.K.: Chloride transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1280: 12-18, 1996.
  60. Matthews, J. B., Awtrey C.S. und Madara, J. L.: Microfilament-dependent activation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransport by cAMP in intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest*, 90: 1608-1613, 1992.
  61. Matthews, J. B., Smith J.A. und Nguyen, H.: Modulation of intestinal chloride secretion at basolateral transport sites: opposing effects of cyclic adenosine monophosphate and phorbol ester. *Surgery*, 118: 147-153, 1995.
  62. Maudsley, S., Zamah, A. M., Rahman, N., Blitzler, J. T., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. und Hall, R. A.: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Association with  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Regulatory Factor Potentiates Receptor Activity. *Mol Cell Biol*, 20: 8352-8363, 2000.
  63. Melvin, J. E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P. J. und Shull, G.: Mouse Down-regulated in Adenoma (DRA) Is an Intestinal  $\text{Cl}/\text{HCO}_3$  Exchanger and Is Up-regulated in Colon of Mice Lacking the NHE3  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger. *J Biol Chem*, 274: 22855-22861, 1999.
  64. Montrose, M. H., Keeley S.J. und Barrett, K. E.: Secretion and absorption: small intestine and colon, 320-355. In: *Textbook of Gastroenterology*. 3rd. Aufl., Philadelphia.
  65. Moseley, R. H., Hoglund, P., Wu, G. D., Silberg, D. G., Haila, S., de la Chapelle, A., Holmberg, C. und Kere, J.: Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*, 276: G185-G192, 1999.
  66. Mullett, W. M., Lai, E. P. C. und Yeung, J. M.: Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. *Methods*, 22: 77-91, 2000.
  67. Muth, T. R., Ahn, J. und Caplan, M. J.: Identification of sorting determinants in the C-terminal cytoplasmic tails of the gamma-aminobutyric acid transporters GAT-2 and GAT-3. *J Biol Chem*, 273: 25616-25627, 1998.

68. Natour, D., Baisch, S., Rossmann, H., Gregor, M. und Lamprecht, G.: (Publikation in Vorbereitung)
69. Niethammer, M., Kim, E. und Sheng, M.: Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci*, 16: 2157-2163, 1996.
70. Orłowski, J. und Grinstein, S.: Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch*, 447: 549-565, 2004.
71. Perheentupa, J., Eklund, J. und Kojo N.: Familial chloride diarrhoea ("Congenital alkalosis with diarrhoea"). *Acta Paediatr Scand Suppl*, 159: 119-120, 2004.
72. Phillips, R.A.: Water and Electrolyte Losses In Cholera. *Fed Proc*, 23: 705-712, 1964.
73. Phillips, S.F. und Giller, J.: The contribution of the colon to electrolyte and water conservation in man. *J Lab Clin Med*, 81: 733-46, 1973.
74. Pointing, C. P.: Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci*, 6: 464-468, 1997.
75. Raghuram, V., Mak, D. O. und Foskett, J. K.: Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *PNAS*, 98: 1300-1305, 2001.
76. Rajendran, V. M. und Binder, H. J.: Cl-HCO<sub>3</sub> and Cl-OH exchanges mediate Cl uptake in apical membrane vesicles of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 264: G874-G879, 1993.
77. Reczek, D., Berryman, M. und Bretscher, A.: Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol*, 139: 169-179, 1997.
78. Reczek, D. und Bretscher, A.: The carboxy-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J Biol Chem*, 273: 18452-18458, 1998.
79. Reczek, D. und Bretscher, A.: Identification of EPI64, a TBC/rabGAP domain-containing microvillar protein that binds to the first PDZ domain of EBP50 and E3KARP. *J Cell Biol* 2001, 153: 191-206, 2001.
80. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second: 1989.

81. Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., Riddle, T. M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Wang, T., Giebisch, G., Aronson, P. S., Lorenz, J. N. und Shull, G. E.: Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Nat Genet*, 19: 282-285, 1998.
82. Schultz, J., Hoffmuller, U., Krause, G., Ashurst, J., Macias M.J., Schmieder, P., Schneider-Mergener, J. und Oschkinat, H.: Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol*, 5: 19-24, 1998.
83. Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., Suster, S., Kondoh, N. und Papas, T. S.: Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 4166-4170, 1993.
84. Sheng, M. und Sala, C.: PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes. *Annu Rev Neurosci*, 24: 1-29, 2001.
85. Shenolikar, S., Minkoff, C. M., Steplock, D. A., Evangelista, C., Liu, M. und Weinman, E. J.: N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization. *FEBS Lett* 2001, 489: 233-236, 2001.
86. Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J. und Milgram, S. L.: An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273: 19797-19801, 1998.
87. Silberg, D. G., Wang, W., Moseley, R. H. und Traber, P. G.: The Down regulated in Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J Biol Chem*, 270: 11897-11902, 1995.
88. Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. und Cantley, L. C.: Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 275: 73-77, 1997.
89. Soutoglou, E., Katrakili, N. und Talianidis, I.: Acetylation Regulates Transcription Factor Activity at Multiple Levels. *Molecular Cell*, 5: 745-751, 2000.
90. Sun, F., Hug, M. J., Lewarchik, C. M., Yun, C.-H. C., Bradbury, N. A. und Frizzell, R. A.: E3KARP Mediates the Association of Ezrin and Protein Kinase A with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Airway Cells. *J Biol Chem*, 275: 29539-29546, 2000.

91. Towbin H., Staehelin T. und Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS, 76: 4350-4, 1979.
92. Turnberg, L. A.: Electrolyte absorption from the colon. Gut, 11: 1049-1054, 1970.
93. Wakabayashi, S., Bertrand, B., Shigekawa, M., Fafournoux, P. und Pouyssegur, J.: Growth factor activation and "H<sup>+</sup>-sensing" of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. J Biol Chem, 269: 5583-5588, 1994.
94. Wang, S., Raab, R. W., Schatz, P. J., Guggino, W. B. und Li, M.: Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). FEBS Lett, 427: 103-108, 1998.
95. Weinman, E. J., Steplock, D., Donowitz, M. und Shenolikar, S.: NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. Biochemistry, 39: 6123-6129, 2000.
96. Weinman, E. J., Steplock, D. und Shenolikar, S.: cAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. J Clin Invest, 92: 1781-1786, 1993.
97. Weinman, E. J., Steplock, D., Wang, Y. und Shenolikar, S.: Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. J Clin Invest, 95: 2143-2149, 1995.
98. Wheat, V. J., Shumaker, H., Burnham, C., Shull, G. E., Yankaskas, J. R. und Soleimani, M.: CFTR induces the expression of DRA along with Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange activity in tracheal epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol, 279: C62-C71, 2000.
99. Woods, D. F. und Bryant, P. J.: Zo-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. Mech Dev, 44: 889-1993.
100. Yanagisawa, J., Takahashi, M., Kanki, H., Yano-Yanagisawa, H., Tazunoki, T., Sawa, E., Nishitoba, T., Kamishohara, M., Kobayashi, E., Kataoka, S. und Sato, T.: The Molecular Interaction of Fas and FAP-1. a Tripeptide Blocker of Human Fas Interaction with Fap-1 Promotes Fas-Induced Apoptosis. J Biol Chem, 272: 8539-8545, 1997.

101. Yun, C. H. C., Lamprecht, G., Foster, D. V. und Sidor, A.: NHE3 Kinase A regulatory protein (E3KARP) binds the epithelial brush border Na/H exchanger, NHE3, and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem*, 273: 25856-25863, 1998.
102. Yun, C. H. C., Oh, S., Zizak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C. M., Weinman, E. J. und Donowitz, M.: cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3010-3015, 1997.
103. Yun, C. H. C., Oh, S., Zizak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C. M., Weinman, E. J. und Donowitz, M.: Correction for vol. 94, p. 3010. *PNAS*, 94: 10006b 1997.
104. Zizak, M., Lamprecht, G., Steplock, D., Tariq, N., Shenolikar, S., Donowitz, M., Yun, C. H. C. und Weinman, E. J.: cAMP-induced Phosphorylation and Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 3 (NHE3) Are Dependent on the Presence but Not the Phosphorylation of NHE Regulatory Factor. *J Biol Chem*, 274: 24753-24758, 1999.

## 8 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei all denen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. M. Gregor, Ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik, danke ich für die Betreuung der Doktorarbeit, für die freundliche Aufnahme in die Gastroenterologischen Forschungslabors seiner Abteilung und für das stetige Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. G. Lamprecht, Abteilung für Innere Medizin I, der Medizinischen Klinik, in dessen Labor die Arbeit durchgeführt wurde, verdanke ich weit mehr als nur die Themenstellung. Er war unmittelbarer Ansprechpartner bei allen Fragen und Problemen, seine unzählbaren Vorschläge und Hilfestellungen waren der entscheidende Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Kalbacher, Leiter des Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum, und seinen Mitarbeitern danke ich für die Synthese der verwendeten Peptide.

Meinen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und für ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. H. Roßmann, die mir in den Anfängen mit viel Geduld meine Fragen beantwortete.

Nicht zu vergessen ist auch die überaus freundliche und kollegiale Atmosphäre unter allen Arbeitsgruppen der Labore im C-Bau der Medizinischen Klinik.

Bei meiner Freundin Christine Anja Wörner, die nicht zuletzt durch hartnäckiges Nachfragen entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat, bedanke ich mich für engagiertes Korrekturlesen und die moralische Unterstützung.

## 9 LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN:

---

Geburtsdatum: 16. Mai 1976  
Geburtsort: Weingarten  
Familienstand: ledig  
Eltern: Manfred Heil und Annemarie Heil, geb. Gessler

### SCHULE:

---

1986-1992 Realschule Bildungszentrum St. Konrad Ravensburg  
Mittlere Reife  
1992-1995 Technisches Gymnasium Ravensburg  
Allgemeine Hochschulreife

### ZIVILDIENTST:

---

11/1995 Rettungsdienst Deutsches Rotes Kreuz in Ravensburg

### UNIVERSITÄT:

---

04/1997 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhardt-Karls-Universität  
Tübingen  
03/1999 Ärztliche Vorprüfung  
03/2000 1. Staatsexamen  
09/2002 2. Staatsexamen

- 10/2002      Beginn Praktisches Jahr  
                 Chirurgie am "The Alfred Hospital" in Melbourne  
                 Innere Medizin am Universitätsklinikum Tübingen  
                 Anästhesie am Universitätsklinikum Tübingen
- 11/2003      3. Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums  
                 am 14.11.03 durch die Ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut

**BERUFSTÄTIGKEIT:**

---

- seit 01/04    AiP an der Medizinischen Klinik I, Universität Tübingen
- seit 10/04    Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik I, Universität Tübingen