

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Anatomie II
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**Untersuchungen zur Expression und Lokalisation des Adaptorproteins
Kanadaptin**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Holger Gößmann
aus Würzburg

Würzburg, September 2009

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Anatomie II
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**Untersuchungen zur Expression und Lokalisation des Adaptorproteins
Kanadaptin**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Holger Gößmann
aus Würzburg

Würzburg, September 2009

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. E. Conzelmann
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 4./5.März.2010

Der Promovend ist Arzt

Meinem Großvater
Herbert Schwelle

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Die Niere, kAE1 und Kanadaptin | 1 |
| 1.1.1. Die Niere: Kontrollorgan des Säure-Basen-Haushaltes | 1 |
| 1.1.2. Klinische Aspekte des Säure-Basen-Haushaltes | 3 |
| 1.1.3. Die Schaltzelle als spezialisierte Zelle zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes | 4 |
| 1.1.4. Kanadaptin | 9 |
| 1.2. Der Zellkern: Proteinimport und -export | 12 |
| 1.3. Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| 2. Material | 20 |
| 2.1. Geräte | 20 |
| 2.2. Chemikalien | 20 |
| 2.3. Enzyme | 21 |
| 2.4. Wichtige Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.5. Oligonukleotide | 22 |

| | | |
|-----------|---------------------------------|-----------|
| 2.6 | Größenstandards | 23 |
| 2.6.1. | DNA-Größenstandards | 23 |
| 2.6.1.1. | SLL-Marker | 23 |
| 2.6.1.2. | F-Marker | 23 |
| 2.6.2. | Protein-Größenstandard | 23 |
| 2.6.2.1. | EPL-Marker | 23 |
| 2.7. | Vektoren | 23 |
| 2.8 | Lebendmaterial | 25 |
| 2.8.1. | Bakterienstämme | 25 |
| 2.9. | Antiseren | 25 |
| 2.9.1. | Erstantikörper | 25 |
| 2.9.2. | Zweitantikörper | 25 |
| 3. | Methoden | 26 |
| 3.1. | Molekularbiologische Methoden | 26 |
| 3.1.1 | Agarose-Gelelektrophorese (AGE) | 26 |
| 3.1.2 | Ethidiumbromid-Färbung | 27 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.1.3. | Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA | 28 |
| 3.1.4. | Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien | 28 |
| 3.1.5. | Anlegen einer Bakteriendauerkultur (Glycerolstock) | 29 |
| 3.1.6. | Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA | 29 |
| 3.1.7. | Elektroporation von Plasmid-DNA | 29 |
| 3.1.8. | Restriktion von DNA | 30 |
| 3.1.9. | Phenolextraktion | 30 |
| 3.1.9.1. | Phenolextraktion bei wässrigen DNA-haltigen Gemischen | 30 |
| 3.1.9.2. | Phenolextraktion bei wässrigen RNA-haltigen Gemischen | 31 |
| 3.1.10. | Ethanol-fällung | 31 |
| 3.1.10.1. | Ethanol-fällung für DNA Ansätze | 31 |
| 3.1.10.2. | Ethanol-fällung für RNA Ansätze | 32 |
| 3.1.11. | Dephosphorylierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Phosphatase | 32 |
| 3.1.12. | Phosphorylierung chemisch synthetisierter Oligonukleotide mittels T4-Polynukleotidkinase | 33 |
| 3.1.13. | Hybridisierung von Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden | 33 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.1.14. | Ligation von DNA-Fragmenten | 33 |
| 3.1.15. | Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) | 34 |
| 3.1.15.1. | Amplifizierung revers-transkribierter RNA (RT-PCR) | 35 |
| 3.1.16 | Herstellung von markierten RNA-Sonden | 36 |
| 3.1.17 | <i>in-situ</i> -Hybridisierung | 37 |
| 3.1.18. | Dot-Blot für Nukleinsäuren | 40 |
| 3.2. | Bakterienwachstum und Aufbewahrung | 40 |
| 3.2.1. | Plattenkulturen | 40 |
| 3.2.2. | Flüssigkulturen | 41 |
| 3.3. | Proteinchemische Methoden | 41 |
| 3.3.1. | Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) | 41 |
| 3.3.2. | Western-Blot | 42 |
| 3.3.3. | Proteinbestimmung mit Amidoschwarz | 44 |
| 3.3.4. | Coomassieblau-Färbung von Proteingelen | 45 |
| 4. | Ergebnisse | 46 |
| 4.1. | Ziele | 46 |

| | | |
|----------------------------------|--|-----------|
| 4.1.1. | Die NLS1 des murinen Kanadaptins ist für die nukleäre Lokalisation eines zytoplasmatischen Proteins ausreichend | 46 |
| 4.1.1.1. | Herstellung des für β -Galaktosidase-NLS1-GFP kodierenden Expressionsvektors pHM829-NLS1 | 46 |
| 4.1.2. | Subzelluläre Lokalisation von β -Galaktosidase-NLS1-GFP | 51 |
| 4.2. | Nachweis von Kanadaptin in verschiedenen Geweben | 52 |
| 4.3. | Untersuchungen der Zelltyp-spezifischen Verteilung der Kanadaptin-mRNA in der Rattenniere mit Hilfe der <i>in-situ</i> -Hybridisierung | 54 |
| 4.3.1. | Herstellung Kanadaptin-spezifischer Transkriptionsvektoren | 54 |
| 4.3.2. | Herstellung von cRNA-Sonden für <i>in-situ</i> -Hybridisierungen | 57 |
| 4.3.3. | ISH von Kryoschnitten der Rattenniere | 58 |
| 5. Diskussion | | 65 |
| 5.1. | Zusammenfassung und Ausblick | 71 |
| 6. Literaturverzeichnis | | 73 |
| 7. Bildverzeichnis | | 84 |
| Danksagung und Lebenslauf | | |

1. Einleitung

Mit Kanadaptin wurde 1998 von Chen et al. ein in der Niere vorkommendes, an den renalen Bicarbonat/Chlorid-Anionenaustauscher AE1 (kAE1) bindendes Protein entdeckt. Aufgrund der Multidomänenstruktur und der Fähigkeit sowohl mitochondrial als auch nukleär vorzuliegen liegt die Annahme nahe, dass Kanadaptin möglicherweise über vielfältige intrazelluläre Funktionen verfügt. Die Einleitung befasst sich daher neben Kanadaptin auch mit funktionellen/klinischen Aspekten des renalen Anionenaustauschers sowie dem Kern-Zytoplasma-Proteintransport.

1.1. Die Niere, kAE1 und Kanadaptin

1.1.1. Die Niere: Kontrollorgan des Säure-Basen-Haushaltes

Die Niere ist ein zentrales Organ des Körpers. Sie übernimmt mehrere lebenswichtige Funktionen für den Organismus. Unter anderem dient sie zur Aufrechterhaltung des Blutdruckes, entgiftet den Körper und dient dem Organismus als Produktionsstätte von Hormonen (z.B. Erythropoetin).

Eine weitere wichtige Funktion der Niere ist die Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Haushaltes. Der größte Anteil der Regulation zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 im Blutkreislauf (ca. 64% der Gesamtpufferleistung) wird durch die Lunge und das offene Puffersystem der leicht flüchtigen Kohlensäure geleistet. Als weitere Puffersysteme stehen dem Körper das Hämoglobin, Proteine und das Hydrogenphosphat zur Verfügung.

Als Funktionseinheit steht der Niere zur Erfüllung dieser Aufgaben das Nephron zur Verfügung. Es besteht aus den Abschnitten Glomerulus, Tubulus proximalis, Tubulus intermedius, Tubulus distalis und Tubulus reuniens. Mehrere Nephrone enden in ein Sammelrohr, die wiederum in die Nierenkelche (Calices renalis) enden. Diese wiederum vereinen sich zum Nierenbecken (Pelvis renalis), das den Endharn über die Ureteren in die Harnblase abgibt (Abb1.1).

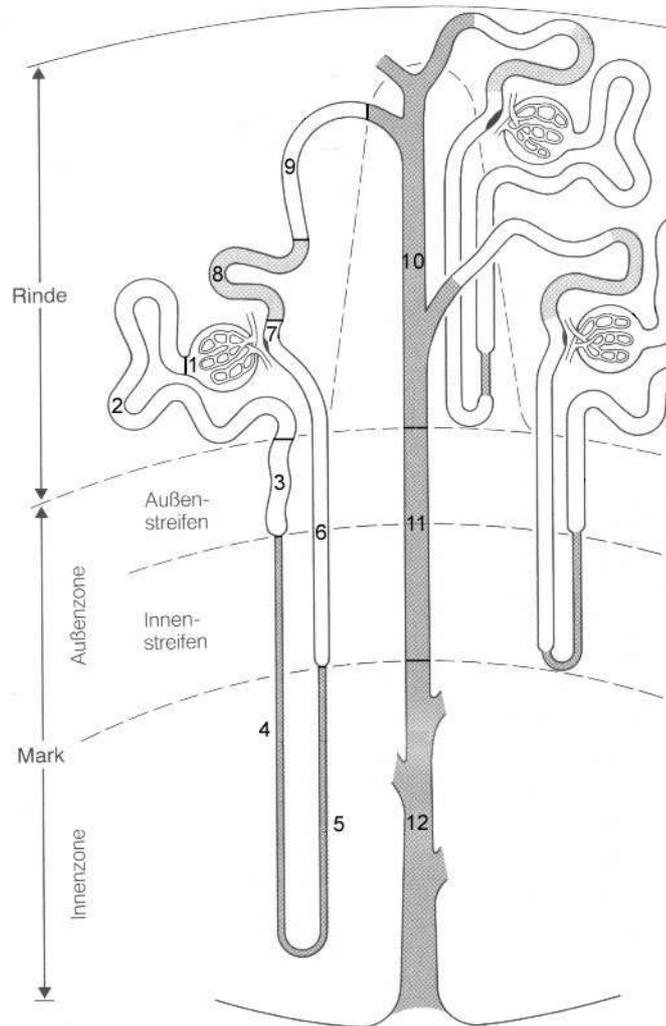


Abb. 1.1. Schematische Darstellung eines Nephrons: (funktionelle Einheit der Niere) (in Anlehnung an: Kriz und Bankir, 1988).

1: Glomerulus 2: Pars convoluta des Tubulus proximalis 3-7: Henlesche Schleife 3: Pars recta des Tubulus proximalis 4: Pars descendens des Tubulus intermedius 5: Pars ascendens des Tubulus intermedius 6: Pars recta des Tubulus distalis 7: Macula densa 8: Pars convoluta des Tubulus distalis 9: Tubulus reuniens (Verbindungstubulus) 10-12: Tubulus renalis colligans (Sammelrohr) 10: Kortikales Sammelrohr 11: Äußeres medulläres Sammelrohr 12: Inneres medulläres Sammelrohr

Durch Ultrafiltration entsteht im Glomerulus der Primärharn, der noch reich an Salzen, Peptiden, kleinen Proteinen, Glukose und Bikarbonat ist. In der Pars convoluta des proximalen Tubulus wird ein Großteil dieser Bestandteile wieder resorbiert. Zusätzlich werden dem Harn Stoffe zugesetzt, die nicht durch den Glomerulus filtriert werden können (z.B. Harnsäure oder bestimmte Medikamente wie Penicillin).

Die Henle-Schleife, die aus den Partes rectae der proximalen und distalen Tubuli, sowie dem Tubulus intermedius besteht, sorgt mit Hilfe eines sog. Gegenstromprinzips für eine weitere Konzentration des Harns. Dabei wird im wasserdichten aufsteigendem Teil der Henle-Schleife NaCl zurückgewonnen, das dem wasserdurchlässigen absteigenden Teil ca. 25% des Primärharnvolumens durch osmotische Wirkung entzieht.

In der Pars convoluta des distalen Tubulus, im Tubulus reuniens und im Sammelrohr wird die fakultative Wasserrückresorption gesteuert. Aldosteron und das antidiuretische Hormon (ADH) haben hier Einfluss auf die Menge der Resorption. Daneben hat dieser Abschnitt entscheidenden Einfluss auf den Säure-Basen-Haushalt des Körpers, indem er je nach Bedarf HCO_3^- oder H^+ -Ionen ausscheidet. Hierbei spielen im Sammelrohr die Hauptzellen und die Schaltzellen eine zentrale Bedeutung. Letztere unterteilen sich wiederum in A- und B-Schaltzellen. Sie werden im Kapitel 1.1.3 genauer erörtert. In aller Regel ist jedoch die Alkalisierung des Blutes durch Ausscheiden von Protonen notwendig, weshalb pathologische Störungen dieser Regulationsmechanismen eine Azidose nach sich ziehen.

1.1.2. Klinische Aspekte des Säure-Basen-Haushaltes

Isolierte oder kombinierte Störungen der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes in der Niere werden als renale tubuläre Azidose bezeichnet. Man unterscheidet zwei Formen:

- die distale renale tubuläre Azidose (RTA-1)
- die proximale renale tubuläre Azidose (RTA-2)

Die RTA-1 beruht auf der Unfähigkeit des Sammelrohres und hier speziell der A-Schaltzellen, ausreichend Protonen in das Lumen zu pumpen. Die Folgen sind eine Harnalkalose mit gleichzeitiger metabolischer Azidose. Aufgrund des zu niedrigen pH-Wertes im Blut kommt es zu einer vermehrten Mobilisation von Kalzium aus dem Knochensystem. Die Folgen sind Rachitis, Osteopenie, Osteomalazie und Hyperkalziurie. Dies führt wiederum zu Nephrolithiasis und Nephrokalzinose, die

wiederum eine terminale Niereninsuffizienz bedingen können. Die zusätzlich auftretende Hypokaliämie bedingt Muskelschwächen bis hin zu Lähmungen und Herzrhythmusstörungen (Alper et al., 2002). Diese Krankheitsbilder beruhen u.a. auf Mutationen im kAE1-Gen, das für den renalen Anionenaustauscher AE1 (siehe Kapitel 1.1.3.) kodiert. So wurden dominante Formen beschrieben, die z.B. zu einem Austausch von Arginin an Position 589 gegen Histidin (R589H), Cystein oder Serin oder an Position 901 gegen ein Stoppcodon führen (C/S901Stop) (Karet et al., 1998; Toye et al., 2004). Als rezessive Formen der RTA-1 wurden von Tanphaipitr et al. (1998) die Mutationen G701D und S773P beschrieben.

Selten kommt es auch zu erworbenen Formen der RTA-1. Diese treten meist in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythromathodes und dem Sjögren-Syndrom auf (Bagga et al., 1993; Siamopoulos et al., 1992).

Bei der RTA-2 handelt es sich hingegen um Störungen im proximalen Tubulus, der neben der Rückresorption von Bikarbonat auch für die Rückgewinnung von u.a. Aminosäuren und Glukose verantwortlich ist. Im Kindesalter wird diese Störung als Fanconi-Syndrom bezeichnet. Die Betroffenen leiden unter Hyperaminoazidurie, Glukosurie und Hyperphosphaturie. Die Folge kann ebenfalls eine Rachitis renalis sein (Cogan, 1982; Rothstein et al., 1990).

1.1.3. Die Schaltzelle als spezialisierte Zelle zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes

Wie bereits erwähnt ist der distale Tubulus und das Sammelrohr der Ort der Sekretion von Protonen in das Lumen des terminalen Nephrons. Zusätzlich wird hier Wasser zurückgewonnen, womit die intrakorporale Blutmenge und somit indirekt auch der Blutdruck reguliert werden. Zur Erfüllung dieser Aufgaben ist dieser Nephronabschnitt mit spezialisierten Zellen ausgestattet.

Die Hauptzellen dieser Nephronregion sind für die Wasserrückresorption verantwortlich und ADH-(Vasopressin)-sensibel. Aquaporin 2 wird unter Einfluss dieses

hypothalamischen Neurohypophysenhormons vermehrt in die apikale Membran der Hauptzellen eingebaut, was die Wasserresorption steigert. Rund 7% des Primärharnvolumens kann über diesen Regelkreislauf variabel in den Blutkreislauf zurückgeführt werden. Dies ist bei der Aufrechterhaltung des physiologischen Blutdruckes ein äußerst wichtiger Regulationsmechanismus.

Die Schaltzellen hingegen sind hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des Säure-Basenhaushaltes verantwortlich. Sie machen rund 40% der Zellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres aus (Kim et al., 1999). Man unterteilt sie in A- bzw. B-Schaltzellen.

Die A-Schaltzellen finden sich hauptsächlich im medullären Sammelrohr und besitzen an der lumenzugewandten apikalen Membran eine H^+/K^+ -ATPase und eine H^+ -ATPase, die unter Energieverbrauch Protonen in das Lumen des Sammelrohres pumpt. Die Protonen werden durch die zytoplasmatische Carboanhydrase gewonnen, die die chemische Reaktion von H_2O und CO_2 in H^+ und HCO_3^- katalysiert. Letzteres wird an der basolateralen Membran durch den renalen Anionenaustauscher kAE1 elektroneutral gegen Cl^- ausgetauscht und somit in die Blutbahn gegeben (Drenckhahn et al., 1985). Die Anionenaustauscher gehören zur Familie der SLC4-Proteine (solute carrier), die aus 10 Genen besteht, die für integrale Membranproteine mit 10-14 Transmembrandomänen codieren. Neben 3 Cl^-/HCO_3^- Austauschern (AE1-3) haben neuere Untersuchungen auch noch einen weiteren Anionenaustauscher AE4 nachgewiesen (Parker et al., 2001; Tsuganezawa et al., 2001), der jedoch mehr Ähnlichkeiten zu den Na^+/HCO_3^- Cotransportern besitzt, als zu den anderen Mitgliedern der AE-Familie (Romero et al., 2004)

Die vornehmlich im kortikalen Abschnitt der Sammelrohre vorkommenden B-Schaltzellen besitzen im Gegensatz zu den A-Schaltzellen einen apikalen Anionenaustauscher (Pendrin), der für die Alkalisierung des Harns durch Zugabe von Bicarbonat verantwortlich ist. Die Protonenpumpen sind in den B-Schaltzellen in der basolateralen Membran lokalisiert.

Die Funktion sogenannter Non-A-non-B Zellen ist dagegen noch nicht geklärt. Derzeit wird sowohl die Sekretion von OH^- , H^+ als auch das kurzfristige Interkonvertieren zwischen den beiden Zelltypen A und B diskutiert (Wall, 2005).

Die Abbildung 1.2. gibt einen schematischen Überblick über die Vorgänge in den verschiedenen Schaltzellen.

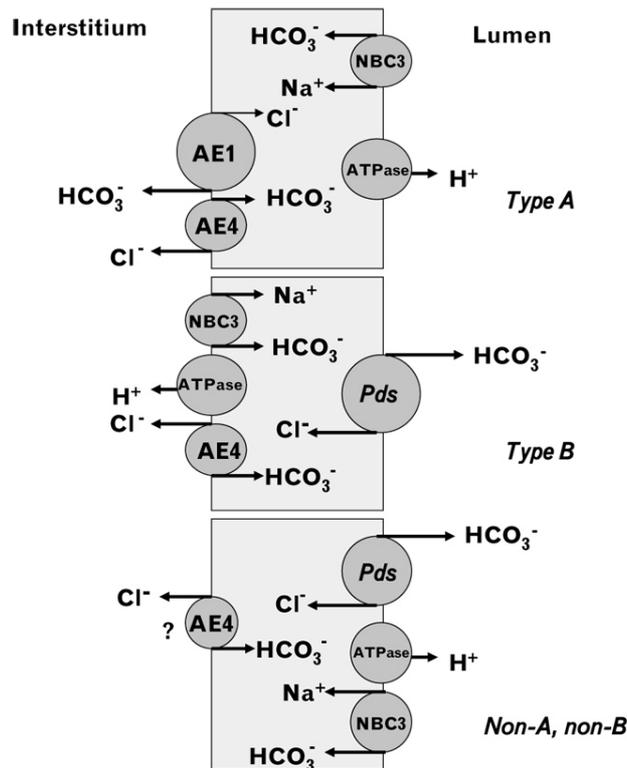


Abb. 1.2. Schematische Darstellung der Schaltzellen (Wall, 2005)
NBC3: Natrium Bikarbonat Symporter; AE: Anionen Austauscher; Pds: Pendrin

Der in den A-Schaltzellen basolateral lokalisierte Anionenaustauscher ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Von Fairbanks et al. (1971) wurde der AE1 in Erythrozyten erstmals beschrieben. Aufgrund seiner Laufhöhe in der Elektrophorese wird er auch als Bande 3 Protein bezeichnet. Er ist für die Aufrechterhaltung des intra- und extrazellulären Säure-Basen-Gleichgewichts, die Regulation der intra- und extrazellulären Cl^- -Konzentration und die Verankerung des submembranären Zytoskeletts mit der Zytoplasmamembran verantwortlich (Tanner, 1997). AE1 gehört wie bereits erwähnt zu einer Familie von Anionenaustauschern,

deren Mitglieder von Genen der SLC4 Familie kodieren und in verschiedenen Geweben des Körpers exprimiert werden (Kopito, 1990; Alper et al., 2002). Alle Mitglieder der AE-Familie zeigen einen langen hydrophilen N-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt, eine hydrophobe Transmembrandomäne sowie ein hydrophiles C-terminales Ende, das ebenfalls zytoplasmatisch liegt. (Alper et al., 2002) Während die Transmembrandomäne hoch konserviert ist, kann über den Einsatz von gewebespezifischen Promotoren vornehmlich das N-terminale Ende modifiziert werden (Tanner, 1997). Die N-terminale zytoplasmatische Domäne enthält auch die Bindungsstellen für verschiedene Proteine des Zytoskeletts. Über Ankyrin und Protein 4.1 und 4.2 erfolgt die Bindung an das Spektrin, welches wiederum das wichtigste Protein des Zytoskeletts des Erythrozyten ist. Damit spielt die erythrozytäre Form des Anionenaustauschers (eAE1) in Verbindung mit der Zytoplasmamembran und dem Zytoskelett eine entscheidende Rolle für die Struktur der Erythrozyten und verleiht diesen Formkonstanz und mechanische Stabilität (Abb 1.3). Störungen im Zusammenspiel dieser Proteine können zu einer hereditären Sphärozytose und zur korpuskulären hämolytischen Anämie führen (Bruce and Tanner, 1999; Renz-Polster and Braun, 1999).

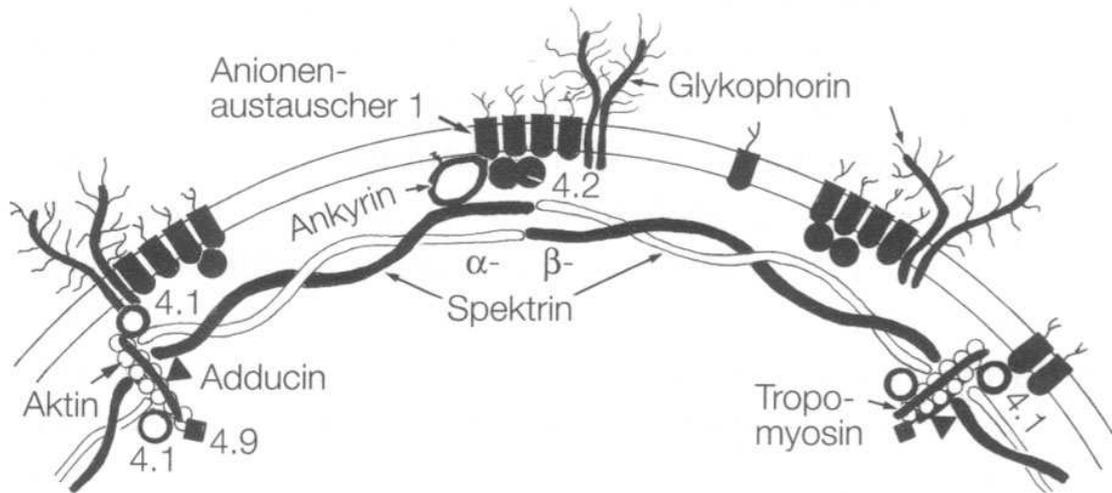


Abb. 1.3. Verbindung der Filamente des Zytoskeletts mit eAE1: (Drenckhahn, 1994). Die Proteine Ankyrin und Protein 4.1 verankern den eAE1 im subplasmalemalen Spektrin-Aktin-Netzwerk. Verschiedene Begleitproteine stabilisieren das Membranzytoskelett.

kAE1 stellt eine Splicevariante von eAE1 dar (Kollert-Jöns et al 1993). Über einen alternativen gewebespezifischen Promotor beginnt die Transkription in den A-Schaltzellen im Intron 3 (Kudrycki and Shull, 1993). Dem nierenspezifischen kAE1 des Menschen fehlen deshalb am N-terminalen Ende die ersten 65 Aminosäuren (Kollert-Jöns et al., 1993). Dort liegt eine von zwei Bindungsstellen für Ankyrin (Michaely and Bennett, 1993). Über die verbliebene Bindungsstelle ist es kAE1 nicht möglich mit Ankyrin wechselzuwirken (Ding et al., 1994; Wang et al., 1995). Entgegen der erythrozytären Form besitzt kAE1 aber die Eigenschaft ausschließlich innerhalb der basolateralen Membran der A-Schaltzellen zu lokalisieren. Weiterhin konnten Huber et al. (1999) zeigen, dass eine azidotische Stoffwechsellage nicht nur zu einem vermehrten Einbau der vesikulär gespeicherten AE1-Reserven in die basolaterale Membran führt, sondern dass es in den A-Schaltzellen auch zu einer vermehrten Transkription von kAE1 kommt. Die Konzentration der mRNA stieg in den Untersuchungen um bis zu 40% (Huber et al., 1999). Um dies gewährleisten zu können muss der Zellkern eine wie auch immer geartete Information über den pH-Wert des Blutes erhalten. Da die

Kommunikation des Zellkerns mit dem Zytoplasma in der vorliegenden Arbeit eine besondere Rolle spielt, soll diese im Kapitel 1.2. näher besprochen werden.

Der Vollständigkeit wegen sollen ebenfalls die Anionenaustauscher AE2 und AE3 Erwähnung finden. AE2 kommt in den Parietalzellen des Magens (Jöns et al., 1994), in den Zellen des Plexus choroideus (Alper et al., 1994) und den Enterozyten des Colons vor (Alper et al., 1999). AE3 befindet sich vor allem im Gehirn (Kopito, 1990), im Herzmuskel (Yannoukakos et al., 1994), in der Netzhaut (Kobayashi et al., 1994) und in der glatten Gefäßmuskulatur (Brosius, III et al., 1997).

1.1.4. Kanadaptin

Auf der Suche nach Bindungspartnern von kAE1 stießen Chen et al. (1998) mittels des Hefe Zwei-Hybridsystems auf ein noch nicht beschriebenes Protein, das sie Kanadaptin (Kidney anion exchanger adaptor protein) nannten. Untersuchungen zeigten, dass Kanadaptin ein 57 kDa großes Protein ist, welches an die zytoplasmatische Domäne von kAE1 bindet, nicht aber an die des eAE1-Proteins. Eine Bindung von Kanadaptin an Ankyrin wurde in dieser Arbeit verneint. Lokalisationsuntersuchungen mittels Immunfluoreszenz an Kaninchennieren zeigten, dass Kanadaptin scheinbar nur in Epithelzellen des Sammelrohrs vorkommt. Während in Hauptzellen ein zytosolisches Verteilungsmuster mit leichter Akzentuierung der Region um die apikale Plasmamembran vorlag, zeigte Kanadaptin in den Schaltzellen eine Kolokalisation mit der vesikulären Speicherform von kAE1. Hingegen zeigte sich keine Immunfluoreszenz der basolateralen Membran, in der der Anionenaustauscher in seiner aktiven Form integriert ist. Die Forschergruppe schloss aus diesen Ergebnissen, dass Kanadaptin an die vesikuläre Form des kAE1 bindet, jedoch nicht mit der aktiven Form interagiert, die in die basolaterale Membran integriert ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Chen et al. (1998) wurde bei immunzytochemischen Untersuchungen in der Rattenniere hinsichtlich der intrarenalen Verteilung von Kanadaptin eine Expression vornehmlich in der Nierenrinde und hier hauptsächlich im proximalen Tubulus nachgewiesen (Hübner et al., 2003). Dort zeigte

Kanadaptin neben einer nukleären Lokalisation, obwohl nicht über eine Signalsequenz verfügend, eine stark mitochondriale Immunreaktion. Mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung von Extrakten aus Rattenenterozyten wurde diese Beobachtung bestätigt. In den A-Schaltzellen ergab sich hingegen keine auffällige Immunfluoreszenz. Insbesondere konnte keine Kolo-kalisation von Kanadaptin und kAE1 in der Rattenniere festgestellt werden, wie sie von Chen et al. (1998) beschrieben wurde. Eine solch duale subzelluläre Lokalisation von Kanadaptin wurde ebenfalls an kultivierten humanen Zellen beobachtet, nicht aber die von Chen et al. (1998) postulierte zytoplasmatische oder vesikuläre/perivesikuläre Verteilung (Hübner et al., 2003).

Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass Kanadaptin eine Src homology 3 (SH3)-Domäne (³⁶⁵LPPKRPELPP) enthält. Über die SH3-Domäne kann die Lokalisierung des betreffenden Proteins zu verschiedenen Zellkompartimenten vermittelt werden (Cohen et al., 1995). Es wurde daher vermutet, dass Kanadaptin im zielgerichteten Transport der kAE1-enthaltenen Vesikel zur basolateralen Membran eine Rolle spielt. Darüber hinaus wurde die Expression von Kanadaptin mittels Northern Blot auch in anderen Geweben als der Niere nachgewiesen. RNA von Kanadaptin konnte im Herz, Gehirn, Hoden sowie in der Lunge, Leber und Skelettmuskulatur nachgewiesen werden (Chen et al., 1998). Da diese Gewebe kein kAE1 bilden liegt die Vermutung nahe, dass Kanadaptin von kAE1 unabhängige Aufgaben übernimmt.

Eine genauere Betrachtung der Sequenz des Mäuse-Kanadaptins zeigt, dass es sich um ein Multidomänenprotein handelt. Besonders auffällig ist das Vorhandensein von 3 Aminosäuresequenzen, sogenannten Kernlokalisationssequenzen (NLS - nuclear localization sequence - siehe Kapitel 1.2.), die Proteinen karyophile Eigenschaften verleihen: NLS1 (¹⁸⁹RKRK), bipartiale NLS (³²⁵KKTELQTTNAENKTKKL) und NLS2 (⁴⁵⁸PKKKKSP). Zusätzlich besitzt Kanadaptin eine Leuzin-Zipper Domäne (²⁴⁴LNSAERELAEISERLKASSKVL), ein Dimerisierungsmodul, das in eukaryontischen Transkriptionsfaktoren vorkommt. Die Leuzin-Zipper-Domäne ist selbst nicht in der Lage an DNA zu binden, kommt jedoch häufig in Nachbarschaft mit der DNA-Erkennungsdomäne am C-Terminus der betreffenden Proteine vor (Vinson et

al., 1989; Landschulz et al., 1988). Darüber hinaus wurden noch eine putative ATP/GTP Bindedomäne (P-Schleife; ⁵⁶ANTTEGKS), eine glutaminreiche Sequenz (³⁸⁶EEEEEEEEEEEEKEEHEE) und eine DSRM (double-stranded RNA binding motif) Sequenz nachgewiesen. Letztere ist in der Lage an z.T. spezifische Doppelstrang-RNA zu binden. Die Domänenstruktur von Kanadaptin ist in Abb 1.4 gezeigt.

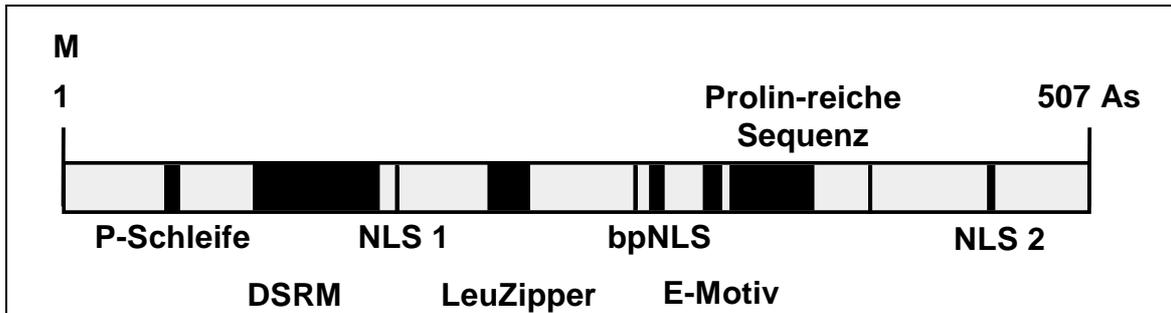


Abb. 1.4. Das Multidomänenprotein Kanadaptin in einer schematischen Darstellung:
P-Schleife: ATP/GTP-Bindemotiv, DSRM: Doppelstrang-RNA-Bindemotiv, NLS: Kernlokalisationssequenz, LeuZipper: Leucinzipper-Domäne, bpNLS: bipartiale Kernlokalisationssequenz, E-Motiv: glutaminsäurereiches Motiv, prolinreiche SH3-Domäne

Möglicherweise könnte Kanadaptin in der Lage sein, intrazellulär Signalfunktionen zu übernehmen und so dem Informationsaustausch zwischen Zytoplasma und Zellkern dienen, z. B. durch eine von Kanadaptin abhängige transkriptionale Regulierung von kAE1. So könnte im Rahmen einer Azidose kAE1 vermehrt gebildet (Ansteigen des vesikulären Pools an kAE1) bzw. in die basolaterale Membran eingebaut werden. Ähnliche Reaktionsmechanismen sind für einige Proteine bereits beschrieben worden. So kommt es beispielsweise im Rahmen von Dauerbelastung der Skelettmuskulatur zur vermehrten Proteinbiosynthese von langsamem Myosin vom Typ I (schwere Kette MHC1). Der hierfür verantwortliche Reaktionsmechanismus ist nahezu vollständig aufgeklärt. Anhaltend hohe Kalziumspiegel führen zu einer Aktivierung der Phosphatase Calcineurin unter Anwesenheit von Calmodulin. Dies führt zu einer Dephosphorylierung von NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T-Cells), dessen multiple Phosphatreste normalerweise die NLS maskieren. NFATc1 wird in den Zellkern transloziert und sorgt dort als Transkriptionsfaktor für eine erhöhte Synthese von MHC1 (Shen et al., 2006). Die Muskelzelle hat somit die Möglichkeit, die Myofibrillen gemäß den aktuellen Anforderungen des Körpers anzupassen.

2000 wurde von Takao Isogai (Helix Research Institute, Genomics Laboratory; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan) die humane Isoform von Kanadaptin aus NT2-Zellen nach zweiwöchiger Retinsäureinduktion isoliert. Dieses ist ein dem Maus-Kanadaptin stark homologes Protein, welches aminoterminal eine 262 Aminosäuren umfassende Extension, sowie eine carboxyterminale Insertion von 25 Aminosäuren unweit der NLS2 aufweist. Weiterführende Untersuchungen von C. Bahr et al. (2003) zeigten, dass in der aminoterminalen Extension ein phosphorylierungsabhängiges Proteinbindemotiv, eine sogenannte FHA-Domäne (Forkhead-Assoziations-Domäne) vorhanden war. Diese Domäne kommt häufig in karyophilen, mit DNA wechselwirkenden Proteinkinasen vor (Allen et al., 1994; Murakami and Okayama, 1995). Für das humane Kanadaptin wurde in dieser Arbeit und in der Arbeit von Kittanakom et al., (2004) eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation beschrieben.

Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu denen von Chen et al. (1998). Interessanterweise ergaben von Kittanakom et al. (2004) durchgeführte Untersuchungen keine detektierbare Interaktion zwischen der humanen Isoform und kAE; weder mit Hilfe der Koimmunopräzipitation noch der Affinitätschromatographie. Gleichzeitig zeigten Expressionsversuche in HEK-Zellen, dass humanes Kanadaptin keinen Einfluss auf den plasmalemmalen Einbau von kAE1 ausübt.

1.2. Der Zellkern: Proteinimport und -export

Eukaryonten besitzen im Gegensatz zu Prokaryonten verschiedene Zellkompartimente mit speziellen Funktionen. Die auffälligste intrazelluläre Struktur ist der Zellkern. Als Speicherort der chromosomalen DNA enthält er fast die gesamte genetische Information und wird damit zum zentralen Steuerelement der Zellfunktionen. Er ist von einer inneren und äußeren Kernmembran umschlossen, die an mehreren Stellen zu verschmelzen scheinen. Hier liegen in der Doppelmembran des Zellkerns eingebettet die sog. Kernporen (NPC - Nuclear Pore Complex), große rundliche Strukturen über die der Zellkern mit dem Zytoplasma funktionell verbunden ist. Diese sind von entscheidender Bedeutung, da transkribierte RNA (tRNA, mRNA), RNP (Ribo-

Nukleoprotein)-Komplexe und ribosomale Untereinheiten den Zellkern verlassen müssen. Umgekehrt müssen alle karyophilen Proteine in den Zellkern importiert werden, da die Proteinbiosynthese ausschließlich im Zytoplasma stattfindet. Nachdem die Kernporenkomplexe bereits 1962 als für den Austausch mit dem Zytoplasma verantwortliche Struktur beschrieben worden waren (FELDHERR, 1962), bewies Bonner 1975, dass die Proteingröße ein entscheidender Faktor für die nukleäre Lokalisation ist. Außerdem stellte er fest, dass bestimmte Proteine (z.B. Histone) schneller in den Zellkern transportiert werden als andere größenäquivalente Proteine und postulierte einen aktiven Transport in den Zellkern (Bonner, 1975a; Bonner, 1975b).

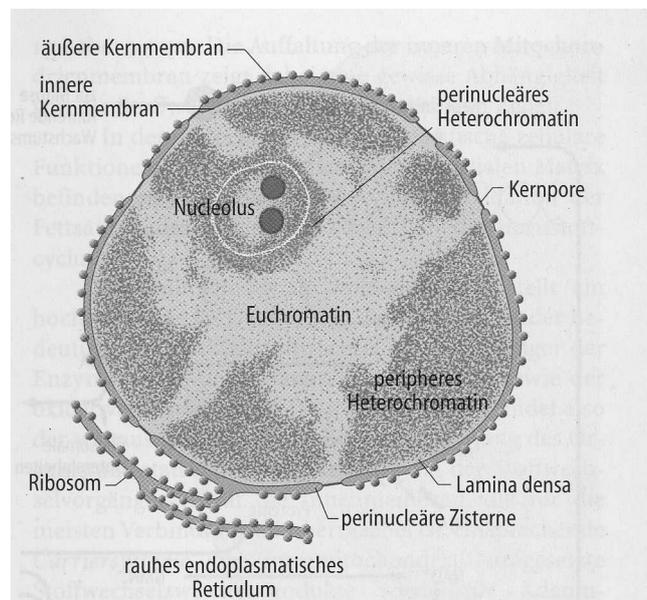


Abb 1.5. Schematische Darstellung eines elektronenmikroskopischen Blicks in den Zellkern (Löffler and Petrides, 1998)

Der NPC ist entlang seiner longitudinalen Achse ein rotationssymmetrischer, hochkonservierter Multiproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 125 MDa (Gasiorowski and Dean, 2003) und besteht aus ca. 30 verschiedenen Nukleoporinen. Mit seinen Filamenten reicht er sowohl in das Zytoplasma, als auch in das Karyoplasma (Fahrenkrog and Aebi, 2003; Suntharalingam and Went, 2003). Früher wurde die Gesamtgröße des permeablen Anteils des NPC mit ca 25 nm angegeben, neuere Untersuchungen haben jedoch eine Größe bis etwa 45 nm ergeben

(Stoffler et al., 2003). Dies entspricht in etwa der maximalen Größe der transportierten Partikel (z.B. dem Nucleocapsid des Hepatitis B Virus) (Pante and Kann, 2002; Alber et al., 2007). In der Mitte des NPC liegt ein etwa 9 nm großer Kanal durch den eine passive Diffusion kleinerer Proteine möglich ist. Ab einer Größe von 40-60 kDa ist kein passiver Durchtritt von Proteinen durch den NPC mehr möglich. Größere Proteine müssen über eine spezielle Kernlokalisationssequenz (NLS) verfügen, um aktiv in den Zellkern transportiert werden zu können. Der aktive Transport wird durch eine Reihe von Transportproteinen ermöglicht. Diese interagieren sowohl mit der NLS des karyophilen Proteins als auch mit bestimmten Nukleoporinen und werden auch als Karyopherine bezeichnet. Karyopherine, die für den Import von Proteinen in den Zellkern verantwortlich sind bezeichnet man als Importine, solche, die einen Export ermöglichen als Exportine. Dabei spielt der asymmetrische Aufbau des NPC eine besonders wichtige Rolle. Importine haben eine hohe Affinität zu den Nukleoporinen der zytoplasmatischen Seite, wohingegen Exportine bevorzugt an Nukleoporine der Kernseite binden.

Die an der Translokation beteiligten Karyopherine folgen einem bestimmten Reaktionsschema und sind einem ständigen Kreislauf unterworfen. (Pemberton and Paschal, 2005). Beim „klassischen“, von Importin α -abhängigen Kernimport bindet zunächst Importin β an die N-terminale Seite des Importin α . Dadurch wird ein autoinhibitorischer Effekt von Importin α aufgehoben und die Bindungsstelle für eine entsprechende NLS am C-terminalen Ende exponiert (Fanara et al., 2000). Das Protein, welches die NLS trägt, bindet auf zytoplasmatischer Seite an das C-terminale Ende eines Karyopherins der Importin α -Familie. Dieses Heterotrimer bindet über Importin β an bestimmte Nukleoporine und wird so in den Zellkern transportiert. Alternativ ist auch eine direkte Bindung von NLS-Sequenzen an Mitglieder der Importin β -Familie möglich. Solche NLSs sind oft schwieriger zu identifizieren und haben Arginin-Glycinreiche Sequenzen. Für Histone und einige ribosomale Proteine wurde ein solcher Reaktionsmechanismus beschrieben (Muhlhauser et al., 2001; Jakel and Gorlich, 1998). Für den Kernimport solcher Importdimere wird dieselbe Endstrecke verwendet wie für das Heterotrimer.

Auf nukleoplasmatischer Seite bindet Ran (ras-related nuclear protein) GTP, das in großer Menge im Zellkern vorliegt, auf N-terminaler Seite mit dem Importin der β -Familie und verdrängt infolge einer Konformationsänderung das Importin α von seiner Bindungsstelle am C-Terminus (Gorlich et al., 1996). Der Komplex aus Frachtprotein und Importin α zerfällt und das NLS-tragende Protein liegt nun in freier Form im Zellkern vor. Das Heterodimer aus RanGTP und Importin β wird sofort wieder aus dem Zellkern exportiert. Das freie Importin α wird von dem Importin- β -Homolog CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility Gene) gebunden und wird ebenfalls RanGTP-abhängig wieder exportiert (Kutay et al., 1997). Der Kreislauf der beteiligten Proteine wird von einem RanGTP/RanGDP-Gradienten getrieben. Dieser Gradient wird u.a. von den Enzymen RanGEF (Ran Guanine Exchange Factor) auf nukleoplasmatischer Seite und dem zytoplasmatischen RanGAP (Ran GTPase-Activating Protein) aufrechterhalten. RanGEF wird aus historischen Gründen auch RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation) genannt und tauscht im Zellkern an Ran gebundenes GDP mit hoher Geschwindigkeit gegen GTP aus (Bischoff and Ponstingl, 1991). Somit ist die Konzentration von RanGTP im Karyoplasma sehr hoch. RanGTP hingegen wird durch RanGAP zytoplasmatisch zu RanGDP hydrolysiert. Eine wichtige Rolle spielt auch der Nuclear Transport Factor 2 (NTF2), der im Zytoplasma RanGDP bindet und in den Zellkern translokalisiert (Ribbeck et al., 1998).

Dagegen erfolgt der Export NES (nuclear export signal)-enthaltener Proteine RanGTP-abhängig durch Crm1 (Chromosome Region Maintenance). Nach Hydrolyse von RanGTP dissoziiert der Komplex zytoplasmatisch (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997). Abb.1.6 fasst die Vorgänge zusammen.

Weiterführende Arbeiten konnten zudem zeigen, dass Ran und Importin- β noch weitere wichtige Funktionen während der Zellteilung übernehmen. Sie sind maßgeblich am Aufbau des Spindelapparates, an der Kinetochorfunktion und am Aufbau der Kernmembran beteiligt (Ciciarello et al., 2004; Arnaoutov and Dasso, 2003; Kalab et al., 2006)

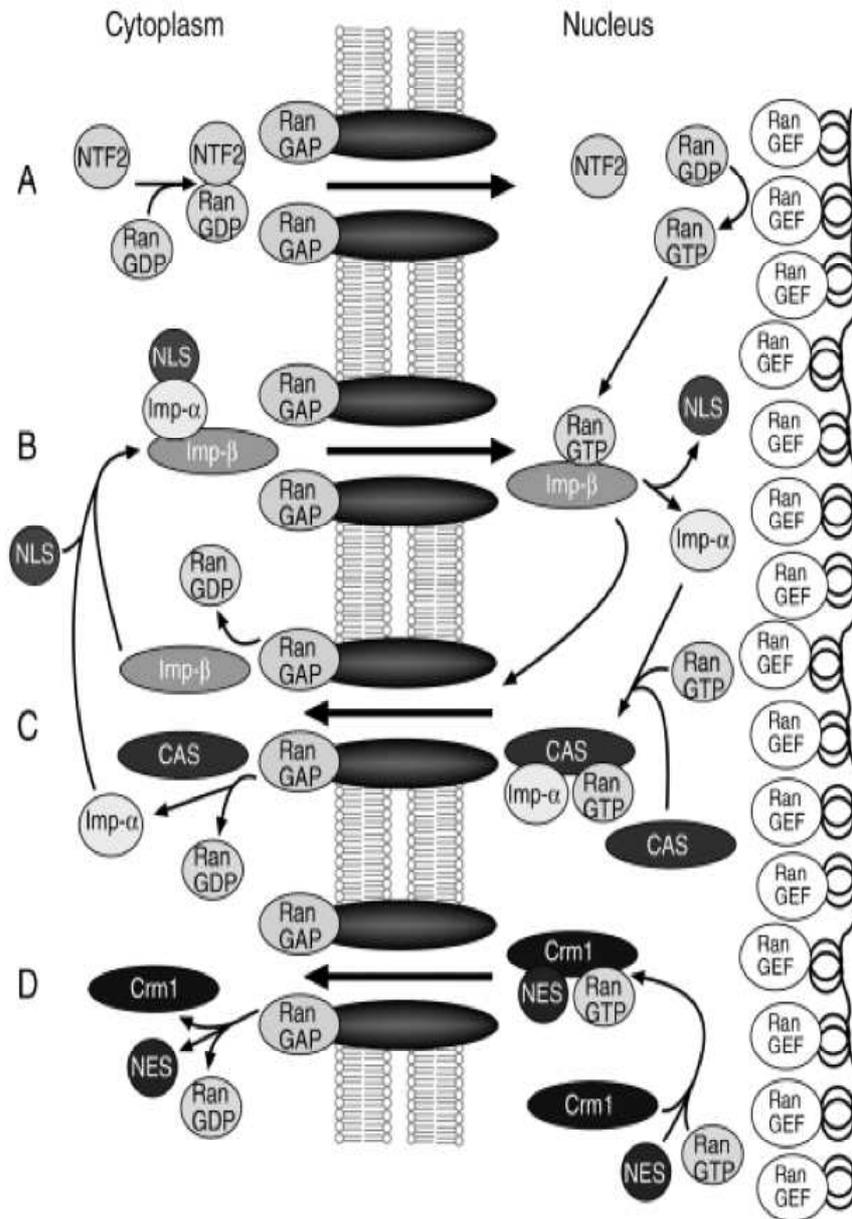


Abb 1.6. Überblick über die Transportmöglichkeiten von Proteinen durch den NPC (Pemberton and Paschal, 2005)

Importine und Exportine erkennen ihre Zielproteine an bestimmten Aminosäure-Sequenzen, die als NLS (nuclear localization signal) für den Kernimport und NES (nuclear export signal) für den Kernexport bezeichnet werden.

Die NLS besteht charakteristischerweise aus basischen Domänen, die reich an den Aminosäuren Lysin und Arginin sind. Erstmals konnte eine solche NLS im SV(Simian Virus)40 large T-Antigen nachgewiesen werden (Kalderon et al., 1984). Die kurze Aminosäureabfolge KKKRK wird deshalb auch als klassische NLS bezeichnet. Daneben gibt es noch Proteine, deren basische Aminosäuren durch eine Gruppe von 5-20 Aminosäuren getrennt sind. Eine solche NLS kann dennoch wirksam sein. Man bezeichnet sie auch als zweiteilige (bipartiale) NLS. Sie konnte zuerst im Nukleoplasmin des *Xenopus* nachgewiesen werden (Robbins et al., 1991). Eine dritte Gruppe von NLSs ist die M9-Sequenz. Anders als die anderen NLSs ist die 38 Aminosäuren umfassende Sequenz glycinreich und ist sowohl für den nukleären Import als auch für den Export verantwortlich. M9 wurde zuerst für das Protein hnRNP (heterogenous nuclear Ribonucleoprotein) A1 beschrieben. Dieses Protein gelangt über seine NLS in den Zellkern, bindet dort mRNA und transportiert diese über die Exportaktivität der M9-Sequenz ins Zytoplasma. Daran anschließend transloziert hnRNP A1 wieder in den Zellkern und ein neuer Transportzyklus beginnt. hnRNP A1 benutzt hierzu ein Shuttleprotein (Transportin), das ca. 25% Sequenzhomologie zu Importin β hat (Siomi and Dreyfuss, 1997; Pollard et al., 1996).

Darüber hinaus wurden weitere wesentlich größere Aminosäureabfolgen in Proteinen für den Kerntransport identifiziert. Von solchen komplexen NLSs lassen sich keine Konsensussequenzen ableiten. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass auch die dreidimensionale Proteinstruktur für den Kerntransport außerordentlich wichtig ist (Rosenblum et al., 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungsvorgänge in unmittelbarer Umgebung der NLS die Geschwindigkeit des Kerntransportes sowohl negativ als auch positiv beeinflussen können (Jans, 1995; Jans and Hübner, 1996).

Der NLS steht die leucinreiche NES gegenüber, die es karyophilen Proteinen ermöglicht, über den Kernporenkomplex in das Zytoplasma zu gelangen. Das HIV-1-Rev Protein und der Proteinkinase A Inhibitor (PKI) der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAPK) waren die ersten Proteine bei denen der Nachweis einer solchen NES gelang (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1994; Wen et al., 1995). Das Rev-Protein

des HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) ist ein frühes Produkt der viralen Gene. Es gelangt nach der Translation in den Zellkern und bindet dort prozessierte mRNA. Die Aufgabe des Rev-Proteins ist es diese RNA zur Translation in das Zytoplasma zu bringen. Hierzu bindet die NES (LPPLERLTLTD) an das Exportin Crm1. Es bleibt zu vermerken, dass viele Proteine die zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma wandern sowohl über eine NES als auch über eine NLS verfügen (Mukaigawa and Nayak, 1991). Durch Untersuchungen mittels eines Heterokaryon-Assays wurde auch für Kanadaptin eine Exportfunktion nachgewiesen (Hübner et al., 2003). Kanadaptin besitzt mehrere leucinreiche Sequenzen, die mit Crm1 interagieren können.

Proteine, die zur freien Diffusion zu groß sind und keine NLS besitzen, können dennoch über den NPC transportiert werden. Hierzu assoziieren die zu transportierenden Proteine mit NLS tragenden Proteinen zu einem Heterodimer, welches importiert werden kann (Booher et al., 1989). Man spricht von einem sogenannten Piggyback-Transport.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob Kanadaptin die Fähigkeit zur Kernlokalisierung besitzt. Dazu sollten die in Frage kommenden NLS-kodierenden cDNA-Sequenzen in Expressionsvektoren eingebracht werden, die speziell für die Identifizierung von Kernlokalisationsuntersuchungen konstruiert wurden. Nach Transfektion von kultivierten eukaryontischen Zellen sollte überprüft werden, ob das neu entstandene Fusionsprotein im Zellkern nachgewiesen werden kann. Dies sollte mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie erfolgen, da die Expressionsvektoren für ein GFP (Green Fluorescent Protein) enthaltene Fusionsprotein kodierten.

Das Vorkommen von Kanadaptin außerhalb der Niere wirft weitere Fragen auf. Besonders aufgrund der Multidomänenstruktur liegt die Vermutung nahe, dass Kanadaptin von kAE1 unabhängige Aufgaben übernimmt. Deshalb sollten die von Chen et al. 1998 veröffentlichten Ergebnisse um weitere Untersuchungen hinsichtlich der Verteilung in den unterschiedlichen Geweben der Maus mit einem monoklonalen Antikörper erweitert werden, da die Präsenz von mRNA nicht notwendigerweise auch

die Anwesenheit des entsprechenden Proteins nach sich zieht. Um auch über die Verteilung im Nierengewebe bessere Aussagen treffen zu können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der intrarenalen Verteilung der Kanadaptin-mRNA. Dies sollte mit Hilfe der *in-situ* Hybridisierung erfolgen.

2. Materialien

2.1. Geräte

| | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| TL100 Ultrazentrifuge | Beckmann, München |
| Cryosector 2800 Frigocut E | Reichert-Jung, Nussloch |
| Eppendorf Mastercycler gradient | Eppendorf, Hamburg |
| Elektroporationskammer Biojet MI | Bio-med, Theres |
| GeneAmp PCR System 2400 | Perkin Elmer, Dreieich |
| Kühlzentrifuge, Model J2-21 | Beckman, München |
| Nitrocellulose | Schleicher und Schuell, Darmstadt |
| Photomikroskop | Zeiss, Jena |
| Schwarz-Weiß-Filme Agfa Pan 25 | Agfa, Düsseldorf |
| Schüttler Unimax 2010 | Heidolph, Schwabach |
| Semi-Dry-Blot-Gerät | von Kreuz, Reiskirchen |
| Spektralphotometer Ultraspec II | Pharmacia Biosystems, Freiburg |
| Sofortbild-Fotopapier ISO 3000/36° | Bachhofer, Reutlingen |
| Sofortbild-Kamera MP4 | Polaroid, England/Angleterre |
| Super-Frost® Plus Objektträger | Menzel, Braunschweig |
| Tiefkühlschrank UF 85-300 S | Colora, Frankfurt |
| Thermoblock | Liebisch, Bielefeld |
| Tischzentrifuge Biofuge A | Heraeus, Hanau |
| Tischzentrifuge Typ 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge Typ 5417 R | Eppendorf, Hamburg |
| Ultraschallgerät Sonifier 250 | Brandson Sonifier Ultrasonics, USA |
| UV-Transilluminator Chroma 43 | Vetter GmbH, Wiesloch |
| Vakuum-Zentrifuge | von Kreuz, Reiskirchen |

2.2. Chemikalien

| | |
|-----------|-----------------|
| Acrylamid | Roth, Karlsruhe |
|-----------|-----------------|

| | |
|---|------------------------------------|
| Agarose | Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Sigma, Deisenhofen |
| Amidoschwarz | Applichem, Darmstadt |
| APS | Carl Roth, Karlsruhe |
| Aqua dest. (Ampuwa [®]) | Fresenius Kabi, Bad Homburg |
| Bromochloroindolylphosphat-p-toluidine (BCIP) | Bachen-Biochemica, Heidelberg |
| p-Coumaric-Acid | Sigma, Deisenhofen |
| Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Fermentas, St.Leon-Rot |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glycerin, Ultra pure [®] | Gibco BRL, Eggenstein |
| Luminol | Fluka, Deisenhofen |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| Penicillin | Boehringer, Mannheim |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma, Deisenhofen |
| Rotiphenol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tetranitrotetrazoliumbluechlorid (TNBT) | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

Alle Lösungen wurden in demineralisiertem Wasser angesetzt. Die Reaktionen fanden, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur (RT) statt.

2.3. Enzyme

CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase, Fermentas[®])

T4 Polynukleotidkinase (Fermentas[®])

T4 Ligase (Fermentas[®])

Taq-Polymerase (Boehringer[®])

Restriktionsenzyme (Boehringer[®], Mannheim; MBI Fermentas[®], St. Leon-Rot)

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Enzyme im mitgelieferten Puffer unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

2.4. Wichtige Puffer und Lösungen

| | |
|---------------------------------|--|
| PBS (phosphate buffered saline) | 137mM NaCl 2,7mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄ |
| TBE-Puffer | 89mM Tris 89mM Borsäure 2mM EDTA |
| TE-Puffer | 10mM Tris/HCl, pH 8,0 0,1mM EDTA, pH 8,0 |

2.5. Oligonukleotide:

Oligonukleotide wurde von Carl Roth und MWG Biotech synthetisiert.

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| NLS1-sense: | 5'-CTAGGGCAGTATCTCGGAAAAGGAAAGCCC-3' |
| NLS1-antisense | 5'-CTAGGGGCTTTCCTTTTCCGAGATACTGCC-3' |
| GFP-us-seq | 5'-GCCATCCAGTTCCACGAG-3' |
| Beta-ds-seq | 5'-CAGTATCGGCGGAATTCC-3' |
| 5'-Kanadaptin | 5'-ATGCGCTTTGGAGGCAGCACTCG-3' |
| 3'-Kanadaptin | 5'-TTAGGGACTCTGAGCCAATCAGTAGC-3' |

2.6. Größenstandards

2.6.1. DNA-Größenstandards

2.6.1.1. SLL-Marker (GeneRuler™ 100 bp-DNA-Leiter) (Fermentas, St.Leon-Rot)

pMLX DNA geschnitten mit *Eco 147I* und *PvuI* (in bp)
(1000 - 900 – 800 - 700 - 600 - 500 - 400 - 300 - 200 - 100 - 80)

2.6.1.2. F-Marker (Fermentas, St.Leon-Rot)

λ-Phage, Wildtyp mit *Eco 91I* geschnitten (in bp)
(14.140 - 8.453 - 7.274 - 6.369 - 5.687 - 4.822 - 4.324 –
3.675 - 2.323 - 1.929 - 1.371 - 1.264 - 702)

2.6.2. Protein-Größenstandard

2.6.2.1. EPL-Marker (Boehringer®, Mannheim)

Premixed Protein Molecular Weight Markers, Low Range (in kDa)
(95,0 – 66,2 – 39,2 – 26,6 – 21,5 – 14,4)

2.7. Vektoren

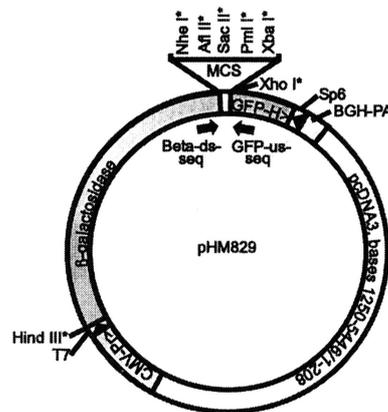
pBluescript Ks (Stratagene®)

pHM829: Der Vektor pHM829 wurde uns freundlicherweise von der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt (mit freundlicher Genehmigung von Gabriele Sorg und Thomas Stamminger). Der Vektor wurde speziell für Kernlokalisationsstudien hergestellt. Als wesentliche Bestandteile enthält er:

1. Green Fluorescent Protein (GFP): Dieses Produkt der *Aequorea victoria*, einer fluoreszierenden Qualle (Chalfie et al., 1994) lässt sich unter dem

Fluoreszenzmikroskop in lebenden oder fixierten Zellen durch die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 488 nm als grün leuchtendes Protein darstellen. GFP besitzt ein Molekulargewicht von 29 kDa.

2. Multiple Cloning Site (MCS): Sie dient der Insertion von cDNA-Fragmenten und enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nhe I*, *Afl II*, *Sac II*, *Pml I* und *Xba I*. Flankierend zur MCS befinden sich die komplementären DNA-Abschnitte für die Primer Beta-ds-seq und GFP-us-seq. So konnte mittels PCR überprüft werden, ob eine Insertion entsprechender cDNA-Fragmente erfolgreich stattgefunden hat.
3. β -Galaktosidase (β -Gal): Die enzymatische Funktion von β -Gal spielt für die Untersuchung der NLS-abhängigen Kerntranslokation keine Rolle. Es ist als Monomer mit 116 kDa zu groß, um passiv in den Zellkern zu diffundieren, und fungierte daher innerhalb von Fusionsproteinen als zytoplasmatischer Retentionsfaktor.
4. CMV-Promotor: Dient in eukaryotischen Zellen der effizienten Transkription entsprechender cDNA-Fragmente.



| Spacer | Nhe I | Afl II | Sac II | Pml I | Xba I | Spacer |
|----------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| GCT.AGG.CCC.GGG.CCC. | <u>GCT.AGC</u> | GGC. <u>CTT.AAG</u> | GGC. <u>CCG.CGG</u> | GGC. <u>CAC.GTC</u> | GGC. <u>TCT.AGA</u> | GGG.CCC.GGG.CCT.AGA |
| A R P G P | A S G | L K G | P R G | H V G | S R G | P G P R |

Abb 2.1. Schematische Darstellung des Vektors pHM829

2.8. Lebendmaterial

2.8.1. Bakterienstämme

DH5 α *deoR*, *end A1*, *gyr A96*, *hsd R17*($r_k^- m_k^+$), *recA1*, *rel A1*, *sup E44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argFV169*), $\phi 80\delta lacZ\Delta M15$, F⁻, λ^- (Stratagene®)

KC8 *hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *pyrF*;Tn5, *hisB463*, *lacDX*, *strA*, *galU*, K(3) (Clontech®)

2.9. Antiseren

2.9.1. Erstantikörper

Anti-Kanadaptin Transduction Laboratories, USA Becton Dickinson, Heidelberg,
(gerichtet gegen die Aminosäuren 60-171 des Kanadaptins der Maus)

2.9.2. Zweitantikörper

Gam-HRP-POX goat-anti-mouse HRP-POX; Sigma, St. Louis, USA (mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG)

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Trennung von DNA- und RNA-Fragmenten verwendet. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel netzähnliche Strukturen bildet, durch die die Nukleinsäurefragmente während der Elektrophorese ihrer Größe entsprechend wandern. Die Konzentration der Agarose im Gel beeinflusst wesentlich die Laufgeschwindigkeit der DNA/RNA-Fragmente. Bei höheren Konzentrationen laufen die Fragmente aufgrund der dichteren Netzstrukturen langsamer. Daher werden bei kleineren DNA/RNA-Fragmenten höhere Agarosekonzentrationen gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen von 0,8% und 1% (w/v) verwendet.

Entsprechend der erforderlichen Konzentration des Gels wurde die gewünschte Menge Agarose in TBE-Puffer gegeben, mittels Mikrowelle aufgeköcht und in einen DNA-Gelträger gegossen. Dabei wurden mit einem Kunststoffkamm Auftragstaschen für die Proben geschaffen. Das Gel wurde dann bei Zimmertemperatur zur Aushärtung belassen. Währenddessen wurde die Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer gefüllt, das Gel nach Aushärtung in die Kammer gegeben und die DNA-Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer in die Geltaschen eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 80 – 120 Volt. Die im Probenpuffer enthaltenen Farbmarker Bromophenolblau und Xylencyanol dienten dabei als gelelektrophoretische Orientierungspunkte. Der Nukleinsäurenachweis erfolgte anschließend über Ethidiumbromid.

Die AGE wurde sowohl als analytisches als auch als präparatives Verfahren verwendet. Analytische Gele dienten zur Kontrolle vorgeschalteter molekularbiologischer Arbeitsmethoden. Auf diese Art konnte bspw. überprüft werden, ob Plasmidpräparationen oder DNA-Restriktionen erfolgreich waren. Das präparative Vorgehen hingegen diente der Elution bestimmter DNA-Fragmente aus einem

Restriktions- oder PCR-Ansatz. Hierzu wurden im Anschluss an eine analytische Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung (siehe 3.1.2.) unter UV-Kontrolle dann die entsprechenden Banden aus dem Gel herausgeschnitten und in Ultrafree MC-Filtereinheiten (0,45 µm) eingebracht. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge. Das so gewonnene DNA-haltige Filtrat wurde gefällt und anschließend eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (siehe 3.1.3.).

Bei der Verwendung von RNA-Proben wurden die Gelkammer und der Gelschlitten zusätzlich vor dem Gebrauch mit 70%igem Ethanol ausgewaschen und alle Stammlösungen mit DEPC-vorbehandeltem Aqua dest. angesetzt. Das Tragen von Handschuhen war hier bei jedem Arbeitsschritt obligat.

6 x Probenpuffer für Polynukleotide:

1mM EDTA (pH 8,0), 50% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromophenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol

3.1.2 Ethidiumbromid-Färbung

(Sambrook and Russel, 2001)

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Trennung folgte die Anfärbung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid. Als planares aromatisches Kation interkaliert Ethidiumbromid zwischen die Basen, wobei seine durch UV-Licht anregbare Fluoreszenz intensiviert wird. Das Agarosegel wurde für 30 Min in eine Schale mit Ethidiumbromid-Lösung (500 ng/ml in 1 x TBE-Puffer) gegeben.

Ethidiumbromid wandelt UV-Licht der Wellenlänge 305 nm in sichtbares orangerotes Licht der Wellenlänge 590 nm um. Unter dem UV-Illuminator können so sichtbar gemachte DNA/RNA-Fragmente mit einer Polaroid-Kamera fotografiert werden. Um die Größe der Fragmente bestimmen zu können wurde jeweils ein Größenstandard (siehe 2.6.1.) mit aufgetragen.

3.1.3. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen kann spektralphotographisch über das Lambert-Beersche Gesetz ($E = OD = I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$; $E =$ Extinktion; $\epsilon =$ molarer Extinktionskoeffizient; $c =$ Konzentration; $d =$ durchstrahlte Schichtdicke) bestimmt werden. Die Extinktion wurde bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge einer Wolfram-Lampe bestimmt. Bei 260 nm besitzen nukleinsäurehaltige Lösungen ihr Absorptionsmaximum. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, bei RNA einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Einen Rückschluss auf die Reinheit des Gemisches lässt der Quotient OD_{260}/OD_{280} zu. Liegt dieser über 1,8 so ist von einem hohen Reinheitsgrad auszugehen. Die Konzentration der Lösung konnte dann wie folgt berechnet werden:

Konzentration der DNA-haltigen Probe in $\mu\text{g/ml}$:

$$[\text{DNA}] = E_{\text{Probe } 260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Konzentration der RNA-haltigen Probe:

$$[\text{RNA}] = E_{\text{Probe } 260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

3.1.4. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um DNA aus Bakterien zu gewinnen, wurden Präparations-Kits der Firma Qiagen eingesetzt. Je nach benötigter DNA-Menge standen Mini, Midi und Maxi-Präparationskits zur Verfügung. Die Präparation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die so gewonnenen DNA-Mengen schwankten zwischen 5 μg (Mini-Präparation) und 500 μg (Maxi-Präparation).

3.1.5. Anlegen einer Bakteriendauerkultur (Glycerolstock)

(modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001)

Mittels eines Glycerolstocks ist es möglich Bakterienkulturen über Jahre hinweg haltbar zu machen. Dazu wurden 500 µl einer Bakterienkultur mit 250 µl 87% Glycerin versetzt und bei -70°C langfristig gelagert.

3.1.6. Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier Plasmid-DNA in Prokaryonten. Hierzu dienten kompetente *E. coli* Bakterien vom Stamm DH5 α . Für die Transformation versetzte man 200 µl kompetenten *E. coli*-Zellen mit 10 – 40 ng DNA. Diese wurden zunächst für 30 min auf Eis gelagert und dann für 90 sec im 42°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz wiederum für 5 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 800 µl LB Medium (mit 10mM Magnesiumchlorid, 10mM Magnesiumsulfat und 20mM Glukose versetzt) wurde der Versuchsansatz für 60 min auf einem Rotationsinkubator bei konstant 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 1 min bei 7.000 rpm zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden abgezogen und verworfen. In den noch verbleibenden 200 µl wurde das Sediment resuspendiert, die Zellen auf eine Platte mit Selektivmedium aufgebracht (bspw. Ampicilin-LB) und diese schließlich bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.7. Elektroporation von Plasmid-DNA

(Walter et al., 1991)

Bei der Elektroporation wurden 1 µl des Ligationsansatzes zu einem 20 µl-Aliquot elektrokompetenter Zellen vom TYP KC8 gegeben, vermischt und luftblasenfrei in eine sterile und auf Eis vorgekühlte Gene-PulserTM-Küvette (Bio-Rad) pipettiert.

Die Küvette wurde in den Elektroporator eingesetzt und der Ansatz bei 1,6 kV, 30 µF und 200 Ohm elektroporiert. Sofort danach wurde zur Aufnahme der Bakterien 1 ml

LB-Medium in der Küvette auf und ab pipettiert und die elektroporierte Bakteriensuspension in ein Greiner-Tube überführt. Nach einer 60 min-Inkubation bei 37 °C und Zentrifugation (2 min, 7.000 rpm) wurden die sedimentierten Bakterien in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer Antibiotikum-enthaltenen Agarplatte ausgestrichen. Alternativ wurde unter Zugabe von weiteren 4 ml LB Medium und einem Antibiotikum (z.B. Ampicillin) eine selektive Flüssigkultur angelegt. Die so behandelten Zellen inkubierten bei 37 °C über Nacht.

3.1.8. Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind hauptsächlich bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA an bestimmten Basenabfolgen (in der Regel 6 Basen) erkennen und spalten. Dabei können glatte (sog. blunt ends) oder überhängende Enden (sog. sticky ends) entstehen. Man unterscheidet den analytischen Ansatz, bei dem ca. 1-2 µg DNA eingesetzt werden, vom präparativen Ansatz, bei dem 5-10 µg zum Einsatz kommen. Präparative Ansätze dienen der Gewinnung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektion (siehe 3.1.1.).

Die Restriktion der Plasmid-DNA erfolgte unter den von Herstellerangaben empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Nach der vorgegebenen Zeitspanne von meist 4-5 Stunden wurden die Ansätze auf Eis gestellt und abschließend einer Phenolextraktion unterzogen.

3.1.9. Phenolextraktion

3.1.9.1. Phenolextraktion bei wässrigen DNA-haltigen Gemischen (modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001)

Die Phenolbehandlung dient dem Extrahieren von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen. Zunächst wurde die wässrige Lösung mit Aqua dest. auf 220 µl aufgefüllt. Dann wurde ein äquivalentes Volumen Rotiphenol pH 7,5-8,0 (Karl Roth, Karlsruhe) zugegeben und gevortext. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 min

bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 220 µl eines 24:1 Gemisches Chloroform:Isoamylalkohol (v/v) versetzt. Die beiden Phasen wurden durch Umdrehen des Eppendorf-Gefäßes vermischt und ebenfalls bei 14.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol wurde wiederholt und die DNA im wässrigen Überstand abschließend in Ethanol gefällt.

3.1.9.2. Phenolextraktion bei wässrigen RNA-haltigen Gemischen

(modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001)

Leicht verändert stellte sich die Arbeitsweise im Umgang mit RNA-haltigen Lösungen dar. Zunächst wurde auch hier die wässrige Lösung mit DEPC-behandeltem Aqua dest. (0,05% (v/v)) auf 220 µl aufgefüllt. Dann wurden 110 µl Rotiphenol pH 4,5-5 (Karl Roth, Karlsruhe) und 110 µl eines 24:1 Gemisches aus Chloroform:Isoamylalkohol (v/v) zugeführt und über vorsichtiges Wenden des Behältnisses vermischt. Das so entstandene Gemisch wurde bei 14.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues DEPC-behandeltes Eppendorf-Gefäß überführt. Diesem wurden 220 µl des Chloroformgemisches zugegeben, die beiden Phasen durch Umdrehen des Eppendorf-Gefäßes vermischt und ebenfalls bei 14.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand ein weiteres Mal in ein neues Behältnis überführt. Der Extraktion schloss sich die Ethanolfällung an. Das Tragen von Handschuhen war hier bei allen Arbeitsschritten obligat.

3.1.10. Ethanolfällung

3.1.10.1. Ethanolfällung für DNA Ansätze

(modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001)

Die Ethanolfällung erfolgte hauptsächlich zur Entsalzung von DNA-Lösungen und zur Konzentrierung DNA-haltiger Lösungen. Hierzu wurde das Volumen der wässrigen Phase bestimmt und mit 1/9 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5,2) sowie dem 2,5 fachen Volumen Ethanol p.a. versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20°C inkubiert und

am nächsten Tag bei 14.000 rpm für 30 min bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml -20°C kaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min in der Tischzentrifuge bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt, die DNA 5 min in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und anschließend in 40 μl Aqua dest. aufgenommen.

3.1.10.2. Ethanol-fällung für RNA Ansätze

(modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001)

Auch hier stellte sich die Vorgehensweise gegenüber der DNA-Fällung leicht verändert dar. Das Volumen der RNA-haltigen Lösung wurde bestimmt und mit 1/9 Volumen 4M Li-Cl₂ sowie dem 2,5-fachen Volumen Ethanol p.a. versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -80°C inkubiert und am nächsten Tag in der Ultrazentrifuge bei 45.000 rpm (entspricht 100.000 G) für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgezogen, das Sediment in -20°C kaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut für 30 min in der Ultrazentrifuge bei 45.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand ein letztes Mal mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt worden war, erfolgte eine 5-minütige Vakuum-Zentrifugation. Das Sediment wurde nun in 40 μl DEPC-behandeltem Aqua dest. aufgenommen und zusätzlich noch mit 0,5 μl RNase-Inhibitor (Fermentas) versetzt. Bei allen Arbeitsschritten wurden Handschuhe getragen.

3.1.11. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Phosphatase

Die Behandlung mit alkalischer Phosphatase spaltet den Phosphatrest am 5' Ende von DNA ab und verhindert so eine nicht gewollte Rezirkularisierung linearisierter Plasmide. Der DNA-haltige Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 43 μl aufgefüllt und mit 5 μl 10 x CIAP-Puffer und 2 μl CIAP versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min in ein 37°C Wasserbad gegeben. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85°C für 10 min gestoppt.

3.1.12. Phosphorylierung chemisch synthetisierter Oligonukleotide mittels T4-Polynukleotidkinase

Diese Behandlung fügt einen Phosphatrest an das 5'-Ende eines chemisch synthetisierten Oligonukleotides und ermöglicht somit über eine Ligase-Behandlung die Insertion einer aus Oligonukleotiden bestehenden DNA-Kassette in ein entsprechend linearisiertes Plasmid. 1 µg des zu behandelnden Oligonukleotids wurde mit Aqua dest. auf 15 µl aufgefüllt. Es wurden 2 µl 10 x Kinasepuffer A (500mM Tris-HCL (pH 7,6); 100mM MgCl₂; 50mM DTT; 1mM spermidine; 1mM EDTA), 2 µl 10mM ATP, und 1 µl T4 Polynukleotidkinase zugegeben. Die Reaktion erfolgte für 30 min im 37° Wasserbad. Durch Erhitzen auf 85°C für 10 min wurde die Reaktion zum Stillstand gebracht.

3.1.13. Hybridisierung von Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden

Die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden diene dem Zusammenführen zweier synthetisch hergestellter zueinander komplementärer Oligonukleotide. Dazu erfolgte eine Inkubation von je 50 pmol entsprechend phosphorylierter Oligonukleotide im Assoziationsansatz für je 10 min bei 80°C, 60°C, 40°C und Raumtemperatur. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz bei -20°C gelagert.

3.1.14. Ligation von DNA-Fragmenten

(modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001)

Um DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können, müssen diese vorher mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Hierbei wird versucht, die Enden der Restriktion so zu wählen, dass die beiden Fragmente überstehende, zueinander kompatible Enden erhalten. Zwischen den Basen solcher sog. sticky ends kommt es zu Wasserstoffbrückenbindungen von komplementären Basen. Durch eine T4-Ligase können diese Wechselwirkungen schließlich über kovalente Bindungen zu einem stabilen DNA-Strang überführt werden. Die Effizienz der Ligation ist im Falle von

überhängenden Enden deutlich höher, als bei glatten Enden (sog. blunt ends) (Sambrook and Russel, 2001)

Die beiden DNA-Fragmente wurden in einem vorher festgelegten Verhältnis (im vorliegenden Falle zwischen 1:10 und 1:50 (w/w) Plasmid:Insert) zueinander in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit Aqua dest. auf 12,5 µl aufgefüllt. Dann wurden 1,5 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 µl T4 Ligase zugesetzt, so dass das Endvolumen 15 µl betrug. Bei größeren Ansätzen wurde jeweils ein Vielfaches der oben genannten Mengen eingesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

3.1.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(modifiziert nach Mullis in Saiki et al., 1985)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der selektiven Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz *in vitro*. Dafür müssen die Sequenzen an den Enden des zu amplifizierenden Abschnittes bekannt sein. Zunächst werden zwei kurze Oligonukleotide (Primer) gewählt, die mit den komplementären Einzelsträngen der DNA-Matrize hybridisieren. Sie sind Startpunkte der thermostabilen DNA-Polymerase I aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Die Oligonukleotide zeigen mit ihren 3'-OH-Enden aufeinander zu, wobei der Sequenzbereich zwischen ihnen amplifiziert wird.

Die Reaktion verläuft in drei Schritten, die als Zyklus mehrmals wiederholt werden und eine annähernd exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes liefert.

Die zu durchlaufenden Schritte sind im Einzelnen:

1. Denaturierung: Bei 94°C lösen sich die beiden DNA-Stränge voneinander und liegen als Einzelstränge vor.
2. Annealing: Die Primer binden mit dem komplementären DNA-Einzelstrangabschnitt.
3. Kettenverlängerung: Die Taq-Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C. Bei dieser Temperatur erfolgt die DNA-Synthese in 5'-3' Richtung.

Die Annealing-Temperatur ist direkt von den eingesetzten Primern abhängig. Zu hoch gewählte Temperaturen verhindern eine Anlagerung der Primer, wohingegen zu niedrige Einstellungen unspezifische Anlagerungen der Primer an nicht komplementäre DNA-Abschnitte fördern. Idealerweise werden zwei Primer gewählt, die eine annähernd gleiche Schmelztemperatur besitzen. Diese wurde von der Fa. MWG Biotech® für die beiden synthetisch hergestellten Oligonukleotide GFP-us-seq mit 54°C und beta-ds-seq 56,2°C errechnet. Die PCR wurde bei einer Annealing-Temperatur von 52° C durchgeführt.

Ein Ansatz enthielt < 100 ng DNA, 2 µl dNTP's (0,2mM), 10 µl 10 x PCR-Puffer (Roche®), je 40 pmol der beiden Primer und 20 µl MgCl₂ (2,5mM). Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 98 µl aufgefüllt. Um die Effizienz der PCR zu erhöhen, wurden 2 µl Taq-Polymerase (0,05 U/µl) erst nach erstmalig erfolgtem Erhitzen auf 94 °C zugegeben. Es wurden 40 Wiederholungen der Arbeitsschritte im Eppendorf Mastercycler (Eppendorf®) durchgeführt.

3.1.15.1. Amplifizierung revers-transkribierter RNA (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Abwandlung der PCR. Mit ihrer Hilfe kann aus einer vorliegenden RNA mittels einer reversen Transkription cDNA gewonnen werden, welche dann mit Hilfe der PCR vermehrt wird. Bei den RT-PCRs kam das TitanTM One Tube RT-PCR System von Boehringer zum Einsatz. Für eine Standard reverse Transkriptasereaktion wurden zwei voneinander unabhängige Ansätze pipettiert:

Ansatz 1: 1 µl dNTPs (10mM); je 4 µl Oligonukleotid (5'- und 3'-Kanadaptin, 10 pmol/µl); 2,5 µl DTT (100mM); 0,25 µl RNase Inhibitor (40 u/µl); 12,25 µl Aqua bidest. (steril); 1 µl RNA (0,5-1 µg) = 25 µl Zwischenvolumen

Ansatz 2: 10 µl 5x RT-PCR Puffer; 14 µl steriles Aqua bidest. (DEPC-behandeltes Ampuwa[®]; Fresenius), 1 µl ExpandTM High Fidelity Enzyme-Mix = 50 µl Endvolumen

Der Enzym-Mix von Boehringer enthielt die reverse Transkriptase AMV(Avian Myeloblastosis Virus). Die Assoziations-temperatur wurde den Kanadaprim-Oligonukleotiden angepasst und lag 5 °C unterhalb der T_m min-Temperatur. Die Ansätze wurden kurz vor Beginn der RT-PCR zusammengegeben. Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt:

1. Reverse Transkription: Einmalig für 30 min bei 50°C
2. Denaturierung: Einmalig für 2 min bei 94°C

35 Zyklen der folgenden drei Schritte

3. Denaturierung: 30 sec bei 94°C
 4. Hybridisierung: 30 sec bei 52°C
 5. Elongation: 1 min bei 68°C
-
6. Elongation: Einmalig für 7 min bei 68°C
 7. Reaktionsstop: bei 4°C

3.1.16. Herstellung von markierten RNA-Sonden

Für die *in-situ*-Hybridisierung ist es notwendig, über detektierbare Oligonukleotidsonden zu verfügen. Wir entschieden uns für Digoxigenin markierte RNA-Sonden und bedienten uns hierfür des Labeling Kits der Firma Roche®, Mannheim. Dabei sind 35% der Uracil-Basen Digoxigenin-markiert, sodass RNA-Sonden später über einen gegen Digoxigenin gerichteten monoklonalen Antikörper nachweisbar sind. Die Vorgehensweise wurde gegenüber den Herstellerangaben wie folgt modifiziert:

1 µg linearisierte Template-DNA wurden zusammen mit 3 µl 10xTranskriptionspuffer, 3 µl DIG-RNA-Labeling Mix, 3 µl RNA-Polymerase und 0,5 µl RNase-Inhibitor in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und der Ansatz mit 0,05% DEPC-Ampuwa (v/v) auf 30 µl aufgefüllt. Nach zweistündiger Inkubation im 37°C Wasserbad wurde das Reaktionsedukt mittels 3 µl RNase freier DNase-I aufgelöst. Dieser Reaktionsschritt erfolgte für 30 min im 37°C Wasserbad und wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5 M

EDTA gestoppt und 5 min auf Eis gestellt. Nach Auffüllen der Ansätze auf 220 µl mit 0,05% DEPC-Ampuwa wurden diese der Phenolextraktion zugeführt.

3.1.17. *in-situ*-Hybridisierung

(Gall and Pardue, 1969)

Die *in-situ*-Hybridisierung ist eine Methode zur Detektion von mRNA mittels einer markierten Nukleotidsonde (cRNA, cDNA oder Oligonukleotide). Die Markierung erfolgt in aller Regel über Haptene wie Biotin oder Digoxigenin, die durch Avidin bzw. Antikörper, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt wurden, nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit kamen ausschließlich Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden zum Einsatz, die über einen AP-markierten Antikörper detektiert wurden. Hierzu wurde ein zur gesuchten mRNA komplementärer RNA-Einzelstrang *in vitro* hergestellt (antisense-RNA). Dieser hybridisiert im untersuchten Gewebe über Wasserstoffbrückenbindungen mit hoher Sensitivität mit der gewünschten mRNA. Somit kann die Verteilung einer mRNA innerhalb eines Gewebeschnittes bzw. Organs Zelltyp-spezifisch verfolgt werden. Jedoch muss die Proteinverteilung nicht notwendigerweise mit der mRNA-Verteilung korrelieren (Kugler, persönliche Mitteilung). Da die Arbeit mit mRNA besondere Anforderungen an die Hygiene stellt, wurde bei allen Arbeitsschritten mit Handschuhen gearbeitet.

Zunächst wurden die Gewebe gewonnen. Dazu wurde Gewebe von frisch geschlachteten männlichen Ratten vom Wildtyp (Wistar-Ratten) entnommen und in flüssigem Stickstoff gekühlten Isopentan vorgefroren. Die Gewebe wurden anschließend in Aluminiumfolie eingewickelt, in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und schließlich – 80°C endgelagert.

Im Cryosector (Reichert-Jung®) wurden bei –20°C 8-14 µm dicke Schnitte des Gewebes angefertigt und auf Superfrost-Objektträger® übertragen. Die so gewonnenen Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 5 min in 4% Formaldehyd in PBS (w/v) fixiert. Anschließend erfolgte eine Entwässerung des Gewebes in absolutem Ethanol bei 4°C über Nacht. Die Gewebeproben wurden am nächsten Tag über eine absteigende

Ethanolreihe (90% für 1 min, 80% für 1 min, 70% für 2 min) rehydratisiert. Dies erfolgte bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Daran anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 2xSSC für je 10 min, sowie eine Deproteinierung, die entweder mit 0,2 M HCl oder mit Proteinase K (1 µg/ml) durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden erneut 2x mit 2xSSC für 5 min gewaschen und anschließend in 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin acetyliert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 2xSSC für 5 min wurden die Gewebeschnitte dem Hybridisierungsschritt zugeführt. Die gewünschte Sondenkonzentration wurde der Hybridisierungslösung (5% Heringssperma-DNA (Sigma, Deisenhofen) in 45% (v/v) 2xHybridisierungspuffer in Formamid) zugeführt. Dieses Gemisch wurde kurz vorher jeweils frisch hergestellt und zur Verhinderung von Sekundärstrukturen bis zum Auftragen auf das Gewebe bei 84°C gelagert. Die auf den Objektträgern positionierten Gewebeschnitte wurden mit einem Silikonring abgedichtet, auf den ein Abstandshalter und ein Abdeckglas gelegt wurden. Das Deckglas wurde mit einem Metallkörper beschwert, so dass eine feuchte Kammer entstehen konnte. Die Versuchsansätze wurden dann in ein abgedecktes Plastikbehältnis, das mit 4xSSC getränkt war, eingebracht und über Nacht bei 60°C im Ofen inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte herausgenommen und mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette gründlich mit 2xSSC abgespült. Anschließend kamen die Proben bei Raumtemperatur für 30 min in eine mit 2xSSC gefüllte Küvette. Dieser Arbeitsschritt erfolgte zur besseren Durchmischung auf dem Schüttler. Die Schnitte wurden dann für 30 min bei 58°C in 50% Formamid in 1xSSC eingebracht und anschließend zweimal mit 2xSSC für je 10 min gewaschen. Die nicht hybridisierten RNA-Stränge wurden nachfolgend mit DNase-freier RNase gespalten. Die hybridisierten Sonden blieben von dieser Behandlung aufgrund der Doppelsträngigkeit unberührt. Dieser Schritt erfolgte bei 37°C für 30 min bei einer Ribonuklease-Konzentration von 40 µg/ml. Das Enzym wurde anschließend durch ein Hochheizen der Proben auf 58°C für 30 min inaktiviert. Die Behandlung erfolgte in RNase-Puffer. Die Objektträger wurden dann in DIG1-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur gegeben und nachfolgend für 30 min mit 1% Blocking-Reagenz (Boehringer®) in DIG1-Puffer

inkubiert. Die Schnitte wurden danach für 15 min bei Raumtemperatur in 0,3% Triton X-100 gegeben. Diese Behandlung erfolgte in einer feuchten Kammer mit 4xSSC. In dieser erfolgte danach auch die Inkubation mit AP-konjugiertem Schaf-Anti-Digoxigenin (Roche®, Mannheim) für 60 min bei einer Konzentration von 1,5 Units/ml. Anschließend wurden die Schnitte mit DIG1-Puffer 2x für 5 min gewaschen und dann für 5 min in DIG3-Puffer (Detektionspuffer) gegeben. Anschließend folgte die Überführung in die Entwicklungslösung, die in einem abgedunkelten Gefäß über Nacht erfolgte. Die Reaktion wurde am nächsten Morgen durch eine DIG4-Behandlung, welche abgedunkelt bei Raumtemperatur erfolgte, gestoppt und die Schnitte auf den Objektträgern mit 2:1 (v/v) Karion F in Aqua dest. eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die Objektträger wurden bei 4°C lichtgeschützt in einer Mappe aufbewahrt.

20xSSC(pH 7,0):

17,8% (w/v) NaCl; 8,8% (w/v) Tri-Na-Citrat-Dihydrat

2xHybridisierungspuffer:

40% (v/v) 20xSSC; 40% (v/v) 50% Dextransulfat in Aqua dest.; 4% (v/v) 50xDenhardts

RNAse-Puffer:

10mM Tris pH 7,5; 0,5M NaCl ; 1mM EDTA

DIG1-Puffer (pH 7,5):

100mM Tris; 150mM NaCl ;

DIG3-Puffer (pH 9,5):

100mM Tris; 100mM NaCl, 50mM MgCl₂

Entwicklungslösung:

12,5 mg TNBT in 35:15 Dimethylformamid:Aqua dest.; 5,5 mg BCIP in Dimethylformamid; in 30 ml DIG3-Puffer

DIG4-Puffer (pH 7,5):

10mM Tris; 10mM EDTA

3.1.18. Dot-Blot für Nukleinsäuren

Der Dot-Blot diente der Qualitätsbeurteilung der für die *in-situ*-Hybridisierung vorgesehenen Sonden, durch Bestimmung der Nachweisbarkeitsgrenzen. Zunächst wurden die Proben auf eine vorher definierte Konzentrationsreihe vorverdünnt. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu die Konzentrationen 100; 10; 1 und 0,1 ng/µl verwendet. Jeweils ein Mikroliter der Verdünnungen wurde mit einer Pipette direkt auf eine an den Seitenrändern aufgehängte Hybrid-N-Folie aufgebracht. Nach 15-minütiger Trocknungsphase wurde die Folie mit DIG1-Puffer angefeuchtet und anschließend für 30 min in 0,5% Blocking-Reagenz (Boehringer®) gegeben. Danach wurde die Folie über eine Stunde mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Schaf-Anti-Digoxigenin (Roche®, Mannheim) bei einer Konzentration des Antikörpers von 1,5 Units/ml in DIG1-Puffer inkubiert. Nach erfolgter Antikörperinkubation wurde die Folie zweimal für 5 min in DIG1-Puffer und ebenfalls zweimal für 5 min in DIG3-Puffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte für 5 min in der im Vergleich zur *in-situ*-Hybridisierung leicht modifizierten Entwicklerlösung. Die Reaktion wird mit Aqua bidest. gestoppt, die Folie über Nacht getrocknet und mittels einer Vakuum-Pumpe in Klarsichtfolie eingeschweist.

Entwicklerlösung für Dot-Blots:

0,45% (v/v) NBT; 0,35% (v/v) BCIP; in DIG3-Puffer

3.2. Bakterienwachstum und Aufbewahrung

3.2.1. Plattenkulturen

Plattenkulturen dienen der selektiven Vermehrung von plasmidenthaltenden Bakterien. Eine Plattenkultur wurde angelegt, indem die Bakterien entweder mit einer sterilen Impföse aus einer Dauerkultur oder mit einem abgeflammten Drigalskispatel aus einer

Flüssigkultur auf einer antibiotikahaltigen LB-Agar Platte (Sambrook and Russel, 2001) ausgestrichen wurden. Die Resistenz gegen das entsprechende Antibiotikum wurde durch das gewünschte Plasmid vermittelt. Somit konnten nur transformierte Bakterien auf dem Medium wachsen. Durch das sofortige Verschließen der Platten mit Parafilm® wurde eine Kontamination mit Pilzen und ein Austrocknen verhindert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Die erhaltenen Einzelkolonien konnten zur Animpfung von Flüssigkulturen verwendet werden.

3.2.2. Flüssigkulturen

Einzelkolonien einer Plattenkultur wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher in 5 ml LB-Medium (modifiziert nach Sambrook and Russel, 2001) angeimpft (Kleinkultur) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden entweder für eine Plasmid-Minipräparation, zum Beimpfen größerer Volumina an LB-Medium (200-500 ml, Plasmid-Maxipräparation) oder zum Anlegen einer Dauerkultur verwendet.

3.3. Proteinchemische Methoden

3.3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE)

Der SDS-Page stellt eine Möglichkeit dar, Proteine rein nach ihrer Länge aufzutrennen. Das negativ geladene Detergens Dodecylsulfat (engl. Sodium dodecyl sulfate oder SDS) maskiert hierbei die tatsächliche Ladung des Proteins und gibt diesem eine negative Gesamtladung. Die Laufgeschwindigkeit ist bei kleineren Proteinen größer, da sie besser durch die Poren des Polyacrylamidgels hindurchwandern können.

Zwei Glasscheiben wurden zunächst gründlich gereinigt und dann durch zwei Abstandshalter voneinander getrennt in die entsprechenden Haltevorrichtungen gespannt. Die Bestandteile des Trenngels wurden zusammenpipettiert und unverzüglich in die entsprechende Vorrichtung gegossen. Die Trenngelphase wurde mit Aqua dest. abgedeckt, bis die Polymerisation beendet war. Daran anschließend wurden die

Bestandteile der Sammelgelphase zusammengegeben und ebenfalls sofort in die Haltevorrichtung pipettiert. Mit einem Plastikkamm wurden Auftragstaschen für die Proben geschaffen. Die Gewebehomogenisate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Auftragen der Proben in die Geltaschen erfolgte die SDS-PAGE in Elektrophoresepuffer für das Sammelgel bei 80 Volt bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Auftrennung im Trenngel bei 150 Volt für ca. 60 min. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Lauffront des Probenpuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Die Proteine wurden anschließend durch Coomassieblau-Färbung sichtbar gemacht oder auf Nitrocellulose elektrotransferiert.

Sammelgel (4% Acrylamid):

12% (v/v) Acrylamid (30%); 25% (v/v) 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,06% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS); 0,3% (v/v) TEMED

Trenngel (10% Acrylamid):

33,5% (v/v) Acrylamid (30%); 25% (v/v) 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,06% Ammoniumperoxodisulfat (APS); 0,3% TEMED

Elektrophoresepuffer:

0,1% (w/v) SDS; 172mM Glycin; 25mM Tris/HCl

2-fach SDS-Probenpuffer:

250mM Tris/HCl (pH 6,8); 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 100mM Dithiothreitol; 0,16% (w/v) Bromphenolblau

3.3.2. Western-Blot

(Burnette, 1981; Sambrook and Russel, 2001)

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine durch das Semi-Dry-Verfahren (Burnette, 1981) auf Nitrocellulose übertragen. Dazu

wurden zunächst Filterpapier und Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt. Das Trenngel wurde ohne Lufteinschlüsse auf die Membran aufgelegt, anschließend zwischen die Filterpapiere geschichtet und luftblasenfrei zwischen die Graphitelektroden der Transferkammer positioniert. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Polyacrylamidgel für 90 min. Bei einer Größe des Minigels von 9 cm x 6 cm x 0,8 cm entsprach dies einer Stromstärke von 43 mA. Zur Überprüfung des Transfers erfolgte die unspezifische reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Rot, die die spätere Immunfärbung nicht beeinträchtigte (Salinovich and Montelaro, 1986). Die Banden der Eichproteine (EPL-Marker) wurden mit Bleistift markiert, um die Laufhöhe der immungefärbten Proteine später näherungsweise bestimmen zu können. Nach Entfernung der Ponceau S-Färbung mit PBS folgte eine Inkubation mit einer Magermilchlösung für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Cellulose-Membran bei 4°C über Nacht mit dem in Magermilchlösung verdünnten Erstantikörper (Anti-Kanadaplin, Transduction Laboratories®) inkubiert. Diese erfolgte zur besseren Durchmischung auf dem Laufrad. Nach Entfernung ungebundener Erstantikörper mit PBS/Tween-20 (3 mal für 5 min) wurde die Nitrocellulose für 1 Stunde mit dem Zweitantikörper Gam –POX IgG/IgM in Magermilchlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden erneut durch PBS/Tween-20 (3 mal 5 min) gewaschen und die Nitrocellulosemembranen der ECL-Entwicklung zugeführt.

Transferpuffer:

25mM Tris/HCl; 192mM Glycerin; 0,1% SDS; 20% Methanol

Ponceau S-Lösung:

0,5% (w/v) Ponceau S; 3% (w/v) Trichloressigsäure in H₂O

Magermilchlösung:

5% (w/v) Magermilch; 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (POX) katalysiert unter Reduktion von H₂O₂ die Redox-Reaktion des ECL-Systems, in deren Verlauf Luminol

zur Chemolumineszenz angeregt wird. Luminol kehrt direkt nach seiner Oxidation aus seinem angeregten Zustand in den Grundzustand zurück. Die dabei emittierten Photonen können mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

Die Nitrocellulosemembranen wurde für 1 min in ein frisch angesetztes 1:1 Gemisch der beiden ECL-Lösungen gegeben, anschließend in die Entwicklungskassette gegeben und frei von Lufteinschlüssen mit Klarsichtfolie bedeckt. Unter Rotlicht erfolgte die Auflage des Chemilumineszenzfilms (HyperfilmTMECLTM High performance chemiluminescence film, Pharmacia), wobei das Bandenmuster des EPL-Markers mit Eddingstift auf der Folie markiert wurde. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Signalintensität und variierte zwischen 1 und 45 min. Die Röntgenfilme wurden direkt im Anschluss in den entsprechenden Lösungen entwickelt, fixiert und getrocknet.

ECL I-Lösung:

2,5mM Luminol; 0,04mM p-Coumaric-Acid; 0,1M Tris/HCl (pH 8,5)

ECL II-Lösung:

0,02 % (w/v) H₂O₂; 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)

3.3.3. Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Die Amidoschwarzfärbung ist eine Möglichkeit, den Proteingehalt einer in Probenpuffer vorliegenden Lösung mittels Extinktion bei 620 nm spektralphotometrisch zu bestimmen. Dabei wird zunächst mittels bekannter Proteinkonzentrationen eine Eichgerade erstellt.

Je 2 mal 10 µl der Eichlösungen (BSA-Lösungen der Konzentrationen 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 µg/10 µl) sowie je 3 mal 10 µl der zu untersuchenden Proben in den Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:50 wurden auf Celluloseazetatfolie (Schleicher und Schuell) pipettiert und getrocknet. Die Folien wurden danach für 10 min bei Raumtemperatur in Färbelösung eingelegt. Nach Entfernung der Hintergrundfärbung mit Entfärbelösung wurden die Folie erneut getrocknet, die einzelnen Auftragespuren

mit einer Schere voneinander getrennt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach Zugabe von je 1 ml Auflösepuffer wurden die Reaktionsgefäße für 30 min in ein 50°C Wasserbad gegeben. Nun wurde die Extinktion bei 620 nm für jede Probe gemessen und mit Hilfe der Eichgerade und der jeweiligen Verdünnung die Konzentration errechnet.

Färbelösung:

0,5% (w/v) Amidoschwarz; 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

47,5% (v/v) Methanol; 5% (v/v) Essigsäure; vor jedem Versuch frisch angesetzt

Auflöselösung:

10% (w/v) Trichloressigsäure; 80% (v/v) Ameisensäure; 10% (v/v) Essigsäure

3.3.4. Coomassieblau-Färbung von Proteingelen

Die Coomassieblau-Färbung ist eine weitere unspezifische Proteinfärbung. Anders als die Ponceau S-Färbung ist sie irreversibel und wird direkt mit dem Polyacrylamidgel durchgeführt.

Das Gel wurde nach Elektrophorese zunächst 15 min in Coomassieblau-Färbelösung gegeben. In Aqua dest. erfolgte dann die Entfärbung durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle und durch Einlegen des Gels in Aqua dest. über Nacht auf dem Schüttler. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Einmach-Cellulose positioniert, in eine Haltevorrichtung gespannt und über Nacht bei 37°C getrocknet.

Coomassieblau-Färbelösung:

0,25% Coomassie® Brillant-Blau R 250 45% (v/v) abs. Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

4. Ergebnisse

4.1. Ziele

Der vorliegenden Arbeit lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. Welche Aminosäuren sind für die nukleäre Akkumulation von Kanadaptin verantwortlich?
2. In welchen Geweben der Ratte kann Kanadaptin nachgewiesen werden?
3. In welchen Zellen der Rattenniere lassen sich Kanadaptin-kodierende Transkripte detektieren?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden subzelluläre Lokalisationsstudien in MDCK-Zellen, Westernblot-Analysen und *in-situ*-Hybridisierungen (ISH) durchgeführt.

4.1.1. Die NLS1 des murinen Kanadaptins ist für die nukleäre Lokalisation eines zytoplasmatischen Proteins ausreichend

4.1.1.1. Herstellung des β -Galaktosidase-NLS1-GFP-kodierenden Expressionsvektors pHM829-NLS1

Betrachtet man die Aminosäuresequenz von Kanadaptin, so fallen drei lysinreiche Abschnitte ins Auge. Im Einzelnen sind dies die Sequenzen RKRK an Position 189-193 (nachfolgend als NLS1 bezeichnet), KKTELQTTNAENKTKK an Position 325-340 (nachfolgend als bpNLS2 bezeichnet) sowie PKKKKSP an Position 458-463 (nachfolgend als NLS3 bezeichnet). Es wurde zunächst der karyophile Charakter der NLS1-Sequenz untersucht, da diese dem klassischen Kernlokalisierungssignal am meisten ähnelt (Kalderon et al., 1984). Hierzu wurde der Expressionsvektor pHM829 eingesetzt (Sorg and Stamminger, 1999). Dieser Vektor enthält kodierende Sequenzen

für die bakterielle β -Galaktosidase und das GFP. Beim GFP handelt es sich um ein grünfluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. Das β -Galaktosidase-GFP Fusionsprotein ist in seiner monomeren Form mit über 146 kDa zu groß, um durch passive Diffusion in den Zellkern zu gelangen. Zwischen den kodierenden DNA-Sequenzen liegt eine MCS (multiple cloning site) mit Schnittstellen u.a für *XbaI*. Sie erlaubt die Insertion kurzer DNA-Abschnitte. Somit eignet sich der Expressionsvektor zur Identifikation kurzer Kerntransport-aktiver Aminosäuresequenzen.

Zunächst wurden zur DNA-Vermehrung kompetente *E. coli* DH5 α in Gegenwart des Vektors pHM829 elektroporiert (siehe 3.1.7.), diese über Nacht bei 37°C inkubiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe eines Plasmid Maxi Kits präpariert (siehe 3.1.4.). Die DNA wurde gelelektrophoretisch analysiert (siehe 3.1.1.) und die DNA-Konzentration für Folgeexperimente spektralphotometrisch bestimmt (siehe 3.1.3.). Ebenso wurde eine Dauerkultur angelegt (siehe 3.1.5.). Anschließend wurde der Vektor mit *XbaI* inkubiert (siehe 3.1.8.), der Restriktionsansatz phenolextrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt (siehe 3.1.9.1. und 3.1.10.1.). Das Ergebnis der Restriktion wurde durch eine konventionelle Agarosegelelektrophorese (0,8% Agarosegel) mit anschließender Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid dokumentiert (Abb 4.1).

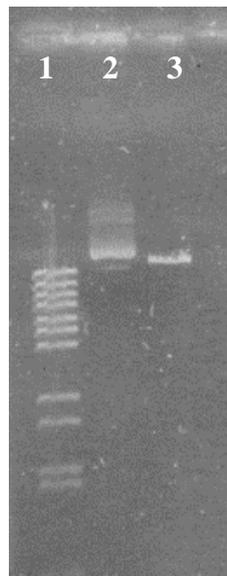


Abb. 4.1. Gelelektrophoretische Analyse des mit *XbaI*-inkubierten Vektors pHM829: Spur 1: DNA-Größenmarker (F-Marker), Spur 2: pHM829 (supercoiled), Spur 3: pHM829 (behandelt mit *XbaI*). Die Elektrophorese erfolgte in einem 0.8% Agarosegel.

Im Anschluss an die *XbaI*-vermittelte Linearisierung wurde der Vektor einer Dephosphorylierungsreaktion unterzogen, um eine spontane Rezirkularisierung des Vektors während des Ligationsschrittes zu verhindern. Hierzu wurde der mit *XbaI*-behandelte Vektor wie unter 3.1.11. beschrieben mit der Phosphatase CIAP behandelt. Zwischenzeitlich wurde in einer Annealingreaktion die NLS1-kodierende DNA-Kassette durch Hybridisierung zweier synthetisch hergestellter Oligonukleotide (NLS1-sense und NLS1-antisense – siehe 3.1.13.) hergestellt. Zuvor wurden die Oligonukleotide jedoch in Gegenwart der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert (siehe 3.1.12.). Infolge der Hybridisierung entstand ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit *XbaI*-kompatiblen überstehenden Einzelsträngen. Zusammen mit dem dephosphorylierten, *XbaI*-behandelten pHM829-Vektor wurde die DNA-Kassette in eine Ligationreaktion eingesetzt (siehe 3.1.14.). Die DNA-Kassette befand sich gegenüber dem Vektor in einem Überschuss von 10:1 bzw. 50:1. Nach erfolgter Ligation wurden sie in *E. coli* DH5 α transformiert. Anstatt den Transformationsansatz auf entsprechende LB-Amp-Agar Platten auszuplattieren wurden die transformierten Zellen über Nacht in LB-Medium/Ampicillin inkubiert und am folgenden Tag die Plasmid-DNA gemäß 3.2.2. präpariert. Die DNA wurde einer Phenolextraktion unterzogen und schließlich mit Ethanol gefällt. Die so gewonnene DNA wurde mit *XbaI* behandelt. Da den rekombinanten d.h. NLS1-cDNA-enthaltenden Vektoren die *XbaI*-Erkennungssequenz fehlte, verblieben diese in Gegenwart des Restriktionsenzym in ihrer supercoiled Form, während rezirkularisierter pHM829 ohne DNA-Kassette linearisiert wurde. Infolge der effizienteren Transformation der Bakterien durch supercoiled DNA erhielt man so eine Anreicherung pHM829-NLS1 enthaltener Bakterien. Die Bakterien wurden auf eine LB-Amp-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA aus je fünf Kolonien der Ansätze 10:1 und 50:1 isoliert und auf einem 0,8%igen Agarosegel analysiert (Abb 4.2). Dabei wurden die fünf Proben der 10:1 Ansätze mit 10-1 bis 10-5 bezeichnet, die der 50:1 Ansätze mit 50-1 bis 50-5.

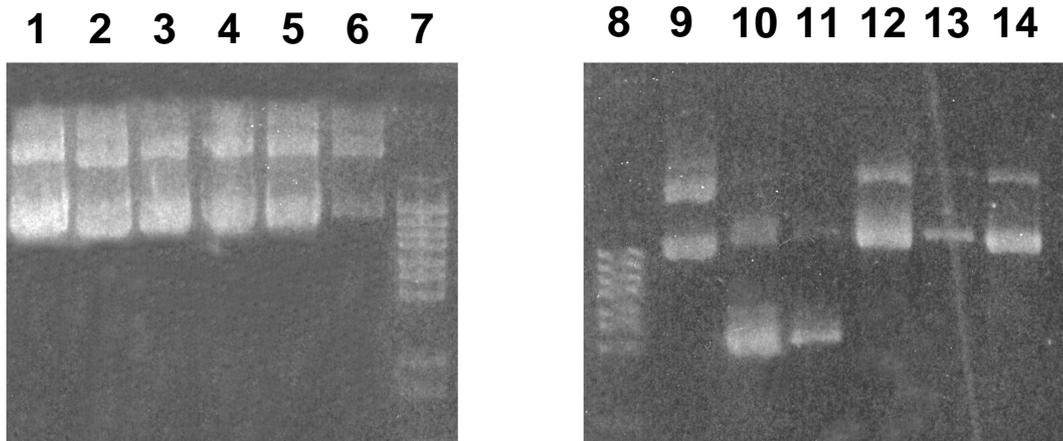


Abb. 4.2. Gelelektrophoretische Analyse putativer pHM829-NLS1-Plasmide: Spuren 1-5: DNA aus Minipreparation (MP) 1-5 der Ligationsansätze mit Insert:Vektor-Verhältnis von 50:1, Spuren 6 und 9: pHM829 (supercoiled), Spur 7 und 8: DNA-Längenstandard (F-Marker), Spuren 10-14: DNA aus MP 1-5 der Ligationsansätze mit Insert:Vektor-Verhältnis von 10:1. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0.8% Agarosegel.

Hierbei zeigten acht der zehn analysierten pHM829-NLS1-Plasmide ein ähnliches Laufverhalten wie das des Vektors pHM829, nicht aber die DNA der Proben 10-1 und 10-2. Sie wurden daher verworfen. Da zwischen rekombinanten und nicht rekombinanten Plasmiden kein Unterschied in der Laufhöhe vorlag wurden alle in Frage kommenden Plasmide (10-3 bis 10-5 sowie 50-1 bis 50-5) mit *XbaI* behandelt. Basierend auf dem Design der NLS1-Kassette sollten sich in Gegenwart des Restriktionsenzym nur pHM829-NLS1-Plasmide nicht hydrolysieren lassen. Die gelelektrophoretische Analyse *XbaI*-behandelter Plasmide zeigt Abb. 4.3. Fünf der acht Plasmide (50-1 bis 50-5) ließen sich nicht durch *XbaI* hydrolysieren, dagegen zeigten die Proben 10-3 bis 10-5 eine partielle Hydrolyse durch *XbaI* und wurden daher verworfen.

pHM829 F-Marker 50-4 50-5 F-Marker pHM829 10-3 10-4 10-5 50-1 50-2 50-3



Abb. 4.3. Gelelektrophoretische Analyse putativer pHM829-NLS1-Plasmide nach *XbaI*-Behandlung: Spur 1 und 6: pHM829 nach *XbaI*-Behandlung (Positivkontrolle), Spur 2 und 5: DNA-Längenstandard (F-Marker), Spur 3,4, 7-12: putative pHM829-NLS1-Plasmide (MP 10-3 bis 10-5 sowie 50-1 bis 50-5) nach Behandlung mit *XbaI*.

Die trotz *XbaI*-Behandlung nicht linearisierten Plasmide wurden einer weiteren Analyse unterzogen, um die Insertion der 30 Basenpaar großen DNA-Kassette direkt nachzuweisen. Diese erfolgte mit Hilfe der PCR (siehe 3.1.15.) in Gegenwart der Oligonukleotide beta-ds-seq und GFP-us-seq. Die Amplifikate wurden gelelektrophoretisch auf einem 0,8%igem Agarosegel untersucht. Rekombinante Plasmide produzierten Amplifikate, die um ca. 30 bp höher liefen (240 bp), als solche von nicht-rekombinanten Plasmiden (210 bp) (Abb. 4.4.).

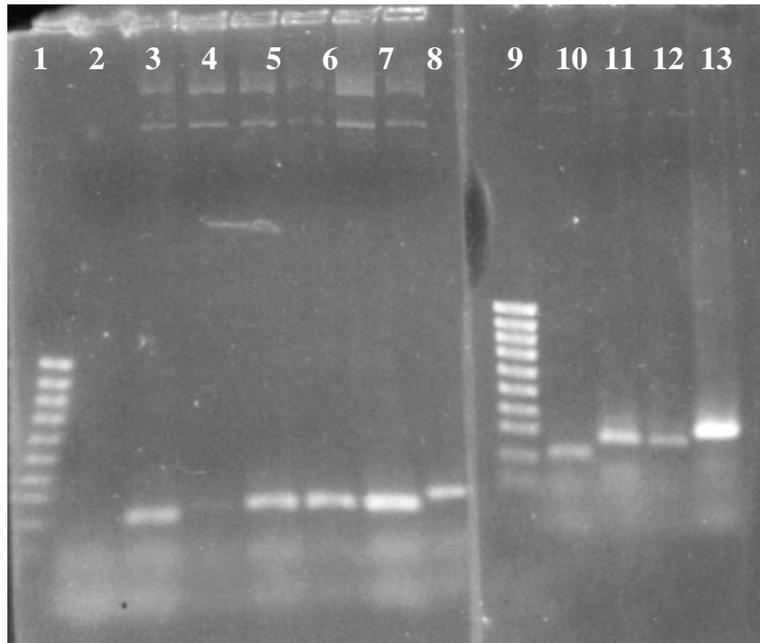


Abb. 4.4. Gelelektrophoretische Analyse der Amplifikate nach PCR putativer pHM829-NLS1-Plasmide: Spur 1 und 9: Längenstandard (SLL-Marker), Spur 2: PCR-Ansatz ohne Zugabe der Oligonukleotide (Negativkontrolle), Spur 3 und 10: Amplifikate von pHM829 (Negativkontrolle), Spur 4-8: Amplifikate der Proben 50-1 bis 50-5 und 11-13: Amplifikate der Proben 10-3 bis 10-5

Die Plasmide, die in der PCR das 240 bp Amplifikat zeigten, wurden schließlich zur Überprüfung der DNA-Sequenz nach Sanger sequenziert. Ein fehlerfreier Vektor wurde herausgesucht und entsprechend der Insertion pHM829-NLS1 genannt.

4.1.2. Subzelluläre Lokalisation von β -Galaktosidase-NLS1-GFP

Zur Transfektion von MDCK-Zellen wurden die Plasmide pHM829-NLS1 und pHM829 verwendet. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd (4%) fixiert und die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Das von pHM829-NLS1 gebildete Fusionsprotein, β -Galaktosidase-NLS1-GFP, zeigte eine deutliche nukleäre Lokalisation, während das NLS1-lose Pendant, β -Galaktosidase-GFP, hauptsächlich im Zytoplasma vorlag (Abb. 4.5.).

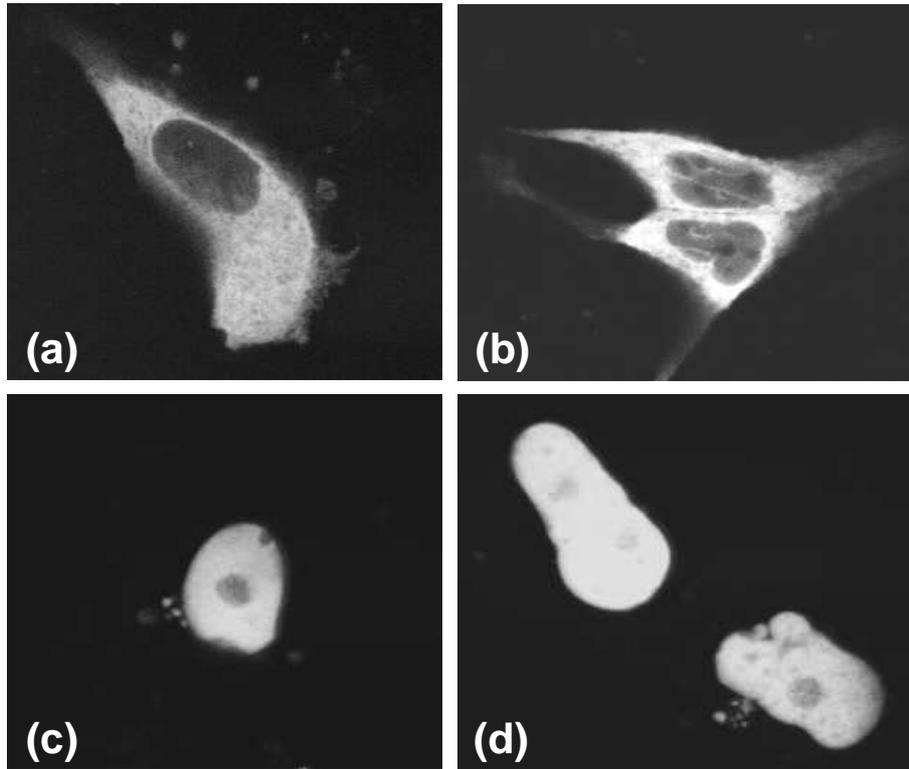


Abb. 4.5. Subzelluläre Lokalisation von β -Galaktosidase-NLS1-GFP in MDCK-Zellen. Während das NLS1-lose Fusionsprotein β -Galaktosidase-GFP (a, b) hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, zeigt das NLS1-enthaltene Fusionsprotein, β -Galaktosidase-NLS1-GFP, eine sehr starke nukleäre Akkumulation (c, d). Gezeigt ist die auf GFP beruhende Fluoreszenz nach Fixierung der MDCK-Zellen mit Formaldehyd.

4.2. Nachweis von Kanadaptin in verschiedenen Geweben

Die Expression von Kanadaptin wurde von Chen et. al (1998) mit Hilfe der Northern Blot-Analyse in verschiedenen Mausgeweben analysiert (Chen et al., 1998). So fanden sich Kanadaptin-spezifische Transkripte im Hoden, in der Lunge, in Leber, Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur und Niere. Die Milz zeigte sich in diesen Untersuchungen negativ. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte nun das Vorkommen von Kanadaptin auf Proteinebene untersucht werden. Hierzu wurde Gewebe von männlichen Ratten vom Wildtyp (Wistar-Ratten) entnommen und im Verhältnis 1:10 (w/v) in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Folgende Organe kamen dabei zur Untersuchung: Skelettmuskulatur (M. psoas major), Lunge, Herz, Niere, Leber, Milz, Kleinhirn (Cerebellum), verlängertes Rückenmark (Medulla oblongata), Brücke (Pons) und

Mittelhirn (Mesencephalon). Das Gewebe wurde im Homogenisator zerkleinert und anschließend für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Bei Raumtemperatur wurden die Proben daran anschließend bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und dieser bei -20°C gelagert. Das Sediment wurde verworfen. Am nächsten Tag erfolgte für alle so gewonnenen Gesamtextrakte die Bestimmung des Proteingehalts mit Hilfe der Amidoschwarzfärbung (siehe 3.3.3.). Schließlich wurden 20 μg der Gesamtextrakte einer SDS-PAGE unterzogen und im Anschluss zur weiteren Western Blot-Analyse auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (siehe 3.3.1. und 3.3.2.).

Eine parallel durchgeführte Coomassieblau-Färbung eines entsprechenden SDS-PAGE-Gels zeigte erwartungsgemäß, dass gleiche Mengen Gesamtprotein pro Gewebe aufgetragen wurden (siehe 3.3.4.). Ebenso zeigte die Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran einen gleichmässigen Proteintransfer. Als Spezifitätskontrolle wurde eine zusätzliche Western Blot-Analyse mit fehlender Erstantikörperbehandlung durchgeführt, die kein Signal lieferte. Der Erstantikörper, anti-Kanadaptin, wurde in Verdünnungen von 1:1.000 bzw. 1:3.000 eingesetzt. Die Behandlung der Nitrozellulosemembran mit dem Zweitantikörper, gam-POX, erfolgte bei einer Verdünnung von 1:5.000 bzw. 1:6.000. Nach ECL-Entwicklung fanden sich starke Signale auf der erwarteten Laufhöhe von 57 kDa für die Gesamtextrakte aus Cerebellum, Medulla oblongata, Mesencephalon, Pons, Leber, Niere und Herz. Schwache Reaktionen zeigten dagegen die Lunge und die Milz. In der Skelettmuskulatur gelang überraschender Weise kein Nachweis von Kanadaptin (Abb. 4.6.).

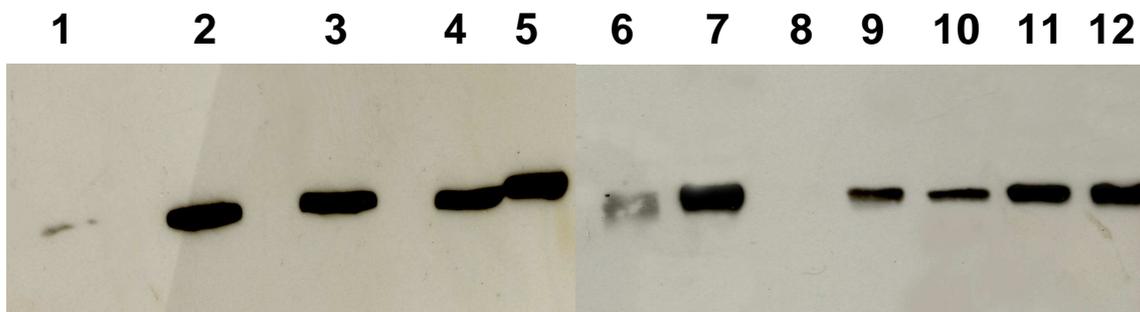


Abb 4.6. Western Blot-Analyse verschiedener Rattengewebe mit anti-Kanadaptin: Gesamtextrakte (20 µg) folgender Gewebe wurden analysiert: Milz (1), Mesencephalon (2), Medulla oblongata (3), Pons (4) Kontrolllysat aus der Niere der Maus (Transduction Laboratories, Heidelberg - 5 und 12), Lunge (6), Leber (7), Skelettmuskulatur (8), Herz (9), Niere (10), Cerebellum (11).

4.3. Untersuchungen zur Zelltyp-spezifischen Verteilung der Kanadaptin-mRNA in der Rattenniere mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung

Die Zelltyp-spezifische Verteilung von Kanadaptin in der Niere des Kaninchen war bereits auf Proteinebene in der Vergangenheit Gegenstand von Untersuchungen (Chen et al., 1998). Dabei wurde das Vorkommen von Kanadaptin nur in Zellen des Sammelrohrs beschrieben. Demgegenüber standen Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen, die an der Niere von Ratten durchgeführt worden waren (Hübner et al., 2003). Hier zeigte sich die Nierenrinde, vor allem der proximale Tubulus als Ort starker Kanadaptin-Bildung. Als komplementärer Ansatz sollte nun mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung (ISH) in Gegenwart nicht-radioaktiv markierter cRNA-Sonden die Verteilung der für Kanadaptin kodierenden mRNA in der Niere der Ratte untersucht werden.

4.3.1. Herstellung Kanadaptin-spezifischer Transkriptionsvektoren

Die von Chen et al. (1998) publizierte cDNA-Sequenz von Kanadaptin diene als Grundlage für die Auswahl der Oligonukleotide 5'-Kanadaptin und 3'-Kanadaptin. Nach Isolierung von Gesamt-RNA aus einer frisch entnommenen Mausnieren wurde durch eine RT-PCR die Kanadaptin-kodierende cDNA amplifiziert (3.1.15.1.). Die Gesamt-RNA wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Hübner (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Neben einem Amplifikat der zu erwartenden Größe (1.5 kBp) ergab die RT-PCR überraschenderweise zwei zusätzliche Banden (Amplifikat a und c in Abb. 4.7.) deren Analyse anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe oblag.

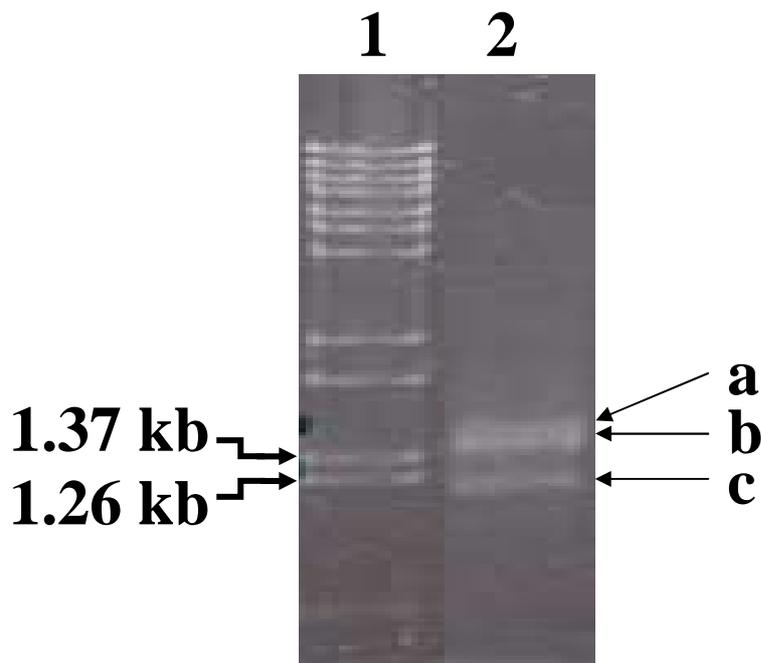


Abb 4.7. Analytische Gelelektrophorese eines Kanadaptin-spezifischen RT-PCR-Ansatzes: Spur 1: Größenmarker (F-Marker), Spur 2: RT-PCR muriner Gesamt-RNA in Gegenwart Kanadaptin-spezifischer Primer. Eine Sequenzanalyse ergab, dass die von Chen et al. (1998) publizierte Kanadaptin-cDNA dem mittleren Amplifikat (b) entsprach.

Alle Amplifikate wurden aus einem 0.8%igem Agarosegel eluiert (siehe 3.1.1.) und zusammen mit einem vorbereiteten T-Vektor (pBluescript KS+-EcoRV•T - freundlicherweise von Herrn Dr. Hübner zur Verfügung gestellt) miteinander ligiert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 α wurde der Ansatz auf LB-Amp-Platten ausplattiert und am darauf folgenden Tag aus Übernachtskulturen Ampicillin-resistenter Kolonien die Plasmid-DNA isoliert. Nach gelelektrophoretischer Identifizierung cDNA-enthaltender Plasmide wurde die Größe der Insertionen mit Hilfe der PCR in Gegenwart der schon zuvor verwendeten Primer (5'- und 3'-Kanadaptin) bestimmt und ausgewählte Plasmide einer Sanger-Sequenzierung unterzogen. Die dem Eintrag in der NCBI-Datenbank entsprechende Kanadaptin-cDNA (mittlere Bande im Agarosegel der Abb. 4.7) wurde nun für die ISH-Untersuchungen vorbereitet und der korrespondierende Vektor pKS-Kanadaptin genannt (Abb. 4.9.). Für die ISH wurden zwei Folgevektoren hergestellt. Nach Behandlungen von pKS-Kanadaptin mit den Restriktionsenzymen *HindIII* bzw. *PstI* wurde nach Agarosegelelektrophorese des Restriktionsansatzes der Restvektor geleluert. Durch die Restriktion wurde die cDNA

von Kanadaptin am 3'-Ende um 841 Bp (nach *HindIII*-Behandlung) und am 5'-Ende um 412 Bp (nach *PstI*-Behandlung) verkürzt (Abb 4.9.). Der eluierte Restvektor wurde nach Phenolextraktion und Ethanol-fällung zur Religation eingesetzt. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α wurde wieder aus Übernachtskulturen Ampicillin-resistenter Kolonien die Plasmid-DNA gewonnen und gelelektrophoretisch analysiert. Die gegenüber dem Ausgangsvektor pKS-Kanadaptin im Agarosegel schneller gewanderten Deletions-Plasmide (Abb. 4.8.) wurden für die ISH-Untersuchungen wie unter 3.1.8 und 3.1.16 beschrieben vorbereitet und abschließend pKS-Kanadaptin Δ *HindIII* bzw. pKS-Kanadaptin Δ *PstI* genannt.

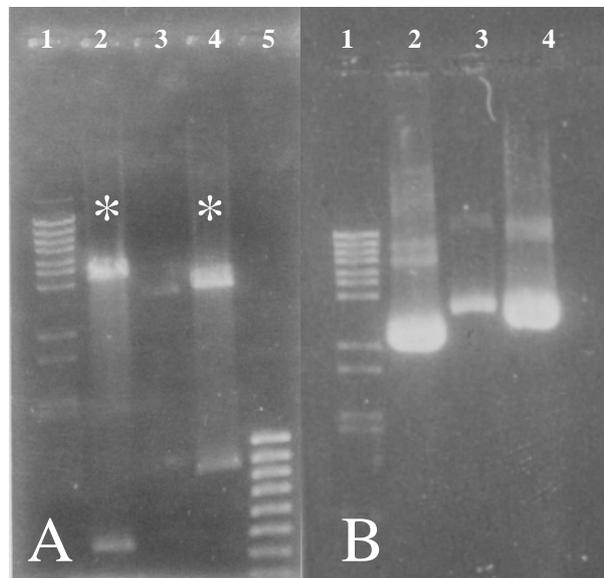


Abb 4.8. Gelelektrophoretische Analyse des mit *HindIII*- bzw. *PstI*-behandelten Transkriptionsvektors pKS-Kanadaptin: Abb. A Spur 1: Längenstandard (F-Marker), Spur 2: pKS-Kanadaptin nach Inkubation mit *HindIII*, Spur 3: pKS-Kanadaptin (supercoiled), Spur 4: pKS-Kanadaptin nach Inkubation mit *PstI*, Spur 5: Längenstandard (SLL-Marker). Die mit * markierten DNA-Fragmente wurden religiert. Aus ihnen entstanden die Transkriptionsvektoren pKS-Kanadaptin Δ *HindIII* und pKS-Kanadaptin Δ *PstI* in Abb. B. Spur 1: Längenstandard (F-Marker); Spur 2: pKS-Kanadaptin Δ *HindIII*; Spur 3: pKS-Kanadaptin; Spur 4: pKS-Kanadaptin Δ *PstI*

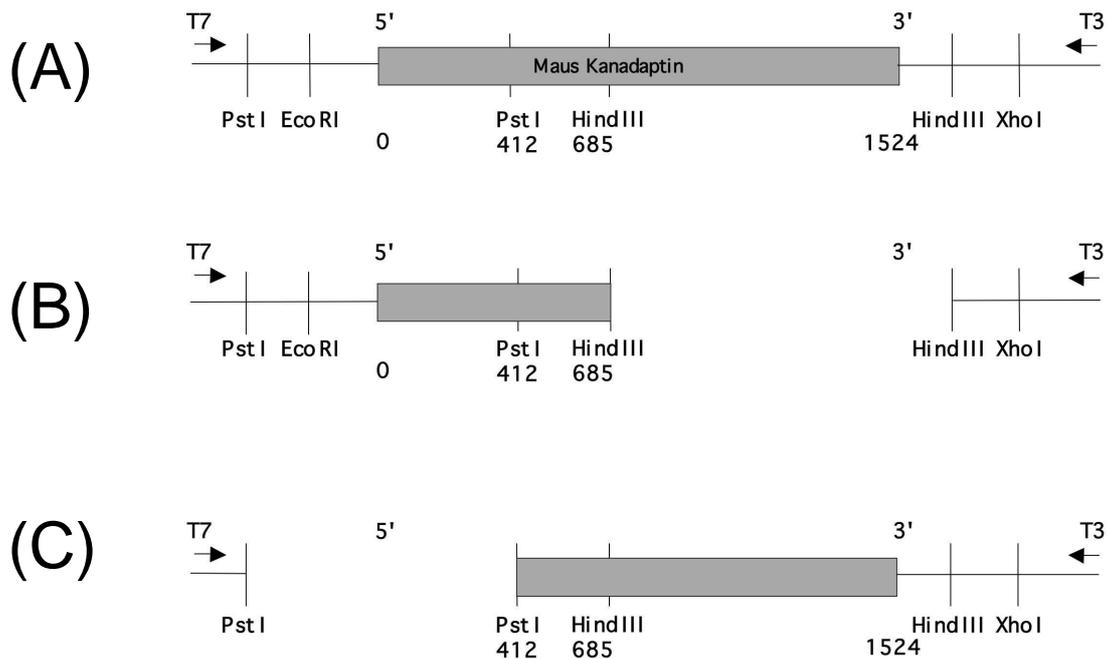


Abb 4.9. Schematische Darstellung der Transkriptionsvektoren: Nur der Teil des Vektors ist gezeigt, der die Kanadaplin-cDNA enthält. (a) pKS-Kanadaplin, (b) pKS-Kanadaplin Δ HindIII, (c) pKS-Kanadaplin Δ PstI. pKS-Kanadaplin- Δ HindIII: Deletion der Kanadaplin-cRNA am 3'-Ende um 841 bp. pKS-Kanadaplin Δ PstI: Deletion am 5'-Ende um 412 bp. T3 und T7 entsprechen den DNA-abhängigen RNA-Promotoren der ungeradzähligen T3- und T7-Phagen.

4.3.2. Herstellung von cRNA-Sonden für *in-situ*-Hybridisierungen

Für die *in vitro* Transkription DIG-markierter cRNA-Sonden wurden die Vektoren pKS-Kanadaplin, pKS-Kanadaplin Δ HindIII bzw. pKS-Kanadaplin Δ PstI linearisiert. Hierzu wurden pKS-Kanadaplin und pKS-Kanadaplin Δ HindIII mit *EcoRI*, pKS-Kanadaplin Δ PstI dagegen mit *PstI* inkubiert, daran anschließend einer Phenolextraktion und Ethanol-Fällung unterzogen und in eine *in vitro* Transkriptionsreaktion eingesetzt (siehe 3.1.16.). Die zur mRNA komplementäre cRNA-Sonde diente als Antisense-cRNA und wurde ausgehend vom T3-Promotor synthetisiert. Als Sense-cRNA wurde die zur mRNA identische Sequenz bezeichnet. Diese wurde vom T7-Promotor synthetisiert. Eine gelelektrophoretische Analyse solcher cRNA-Sonden ist in Abb 4.10. gezeigt. Die Konzentrationen der Transkriptionsansätze wurde abschließend über Photodensitometrie bestimmt, die cRNA-Sonden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Im Folgenden werden die cRNA-Sonden entsprechend ihres Ausgangsvektors benannt: d.h. a/s-cRNA-Kanadaptin, a/s-cRNA-Kanadaptin Δ *HindIII* und a/s-cRNA-Kanadaptin- Δ *PstI*. Das Präfix a bzw. s deutet daraufhin, dass es sich hier um die antisense bzw. sense cRNA handelt.

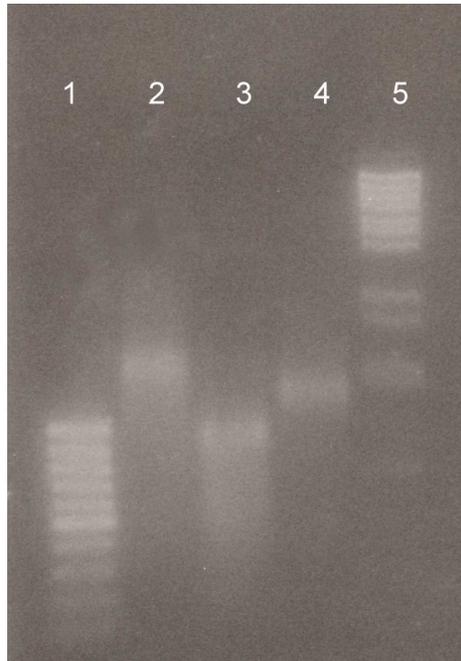


Abb 4.10. Gelelektrophoretische Analyse der antisense cRNA-Sonden: Spur 1: Längenstandard (SLL-Marker); Spur 2: a-cRNA-Kanadaptin (DIG-markiert); Spur 3: a-cRNA Kanadaptin Δ *HindIII* (DIG-markiert); Spur 4: a-cRNA-Kanadaptin Δ *PstI* (DIG-markiert); Spur 5: Längenstandard (F-Marker).

4.3.3. ISH von Kryoschnitten der Rattenniere

Für die ISH wurde männlichen Wistar-Ratten vom Wildtyp die Niere entnommen und von dieser mit Hilfe eines Kryostats Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 8-14 μ m hergestellt. Daran anschließend wurden die Kryoschnitte auf Superfrost® Objektträger aufgebracht. Die Sondenkonzentration der cRNA-Sonden betrug in allen ISH-Experimenten zwischen 5 und 15 ng/ μ l, wobei sich die Signalintensität mit steigender Sondenkonzentration erhöhte, ohne dass nennenswerte unspezifische Bindungen zu verzeichnen waren. Bei einer Sondenkonzentration über 15 ng/ μ l kam es jedoch mehr und mehr zu einem Ausfallen von Farbpigmenten, was die Bildqualität

einschränkte. Des Weiteren korrelierte die Sondenlänge mit der Intensität des ISH-Signals. Als kürzeste cRNA-Sonde lieferte a-cRNA-Kanadaptin Δ *HindIII* das stärkste Signal, a-cRNA-Kanadaptin hatte dagegen, als längste cRNA-Sonde, die geringste Intensität. Dies deutete auf eine bessere Gewebepenetration kürzer Sonden hin.

Die ISH-Untersuchungen ergaben für alle drei cRNA-Sonden übereinstimmend, dass Kanadaptin-spezifische Transkripte sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark vorkommen (siehe unten). Das Signal war im Rindenbereich jedoch deutlich stärker. Diese Beobachtung deckte sich mit immunhistochemischen Untersuchungen, die an der Kaninchenniere durchgeführt worden waren (Hübner et al., 2003). Die ISH war im kortikalen Bereich innerhalb periglomerulärer Areale am stärksten, während Markstreifen deutlich schwächere Signale zeigten (Abb 4.12. - 4.14). Betrachtete man das Mark, so schwächte sich die Intensität der ISH mit dem Beginn der Außenzone deutlich ab (Abb. 4.15.). Leider machte die große Sondenlänge eine starke Deproteinierung mit HCl oder Proteinase K erforderlich, so dass eine sequentielle Antikörperbehandlung des entsprechenden Kryoschnittes, zur Identifizierung der ISH-positiven Zellen mit Antikörpern gegen Villin (spezifisch für proximale Tubuluszellen) und Na⁺-K⁺-ATPase (spezifisch für distale Tubuluszellen) nicht möglich war. Immunhistochemische Untersuchungen von Dr. Hübner zeigten jedoch, dass Kanadaptin in der Rattenniere hauptsächlich im proximalen Tubulus vorkommt, was sich mit den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit deckt (Hübner et al., 2003) (Abb 4.16). Die Nierenkörperchen (Corpuscula renalis) selbst waren frei von jedem ISH-Signal. Ebenfalls frei blieben die in der Innenzone des Marks gebündelt laufenden Vasa rectae. Die parallel mit einer Sense RNA-Sonde durchgeführte ISH blieb stets ohne Signal (Abb 4.11).

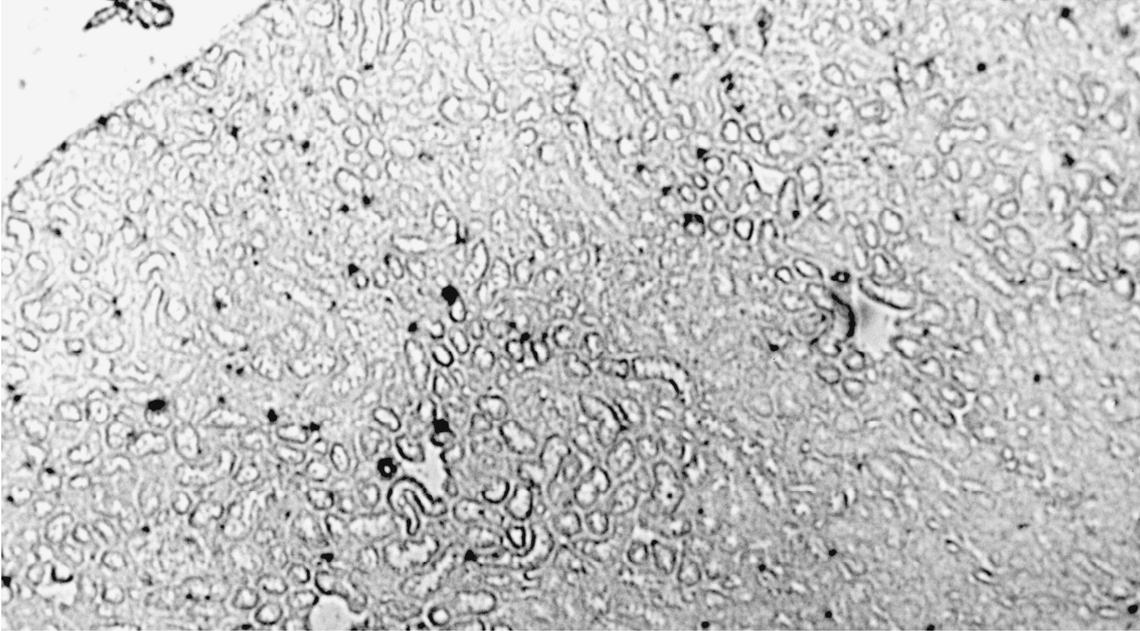


Abb 4.11. Nieren-Gefrierschnitte der Ratte nach ISH mit s-cRNA-Kanadaptin: Es lassen sich keine spezifischen Färbungen abgrenzen. Es zeigen sich lediglich unspezifische Farbniederschläge, z.B in Form von schwarzen Punkten.

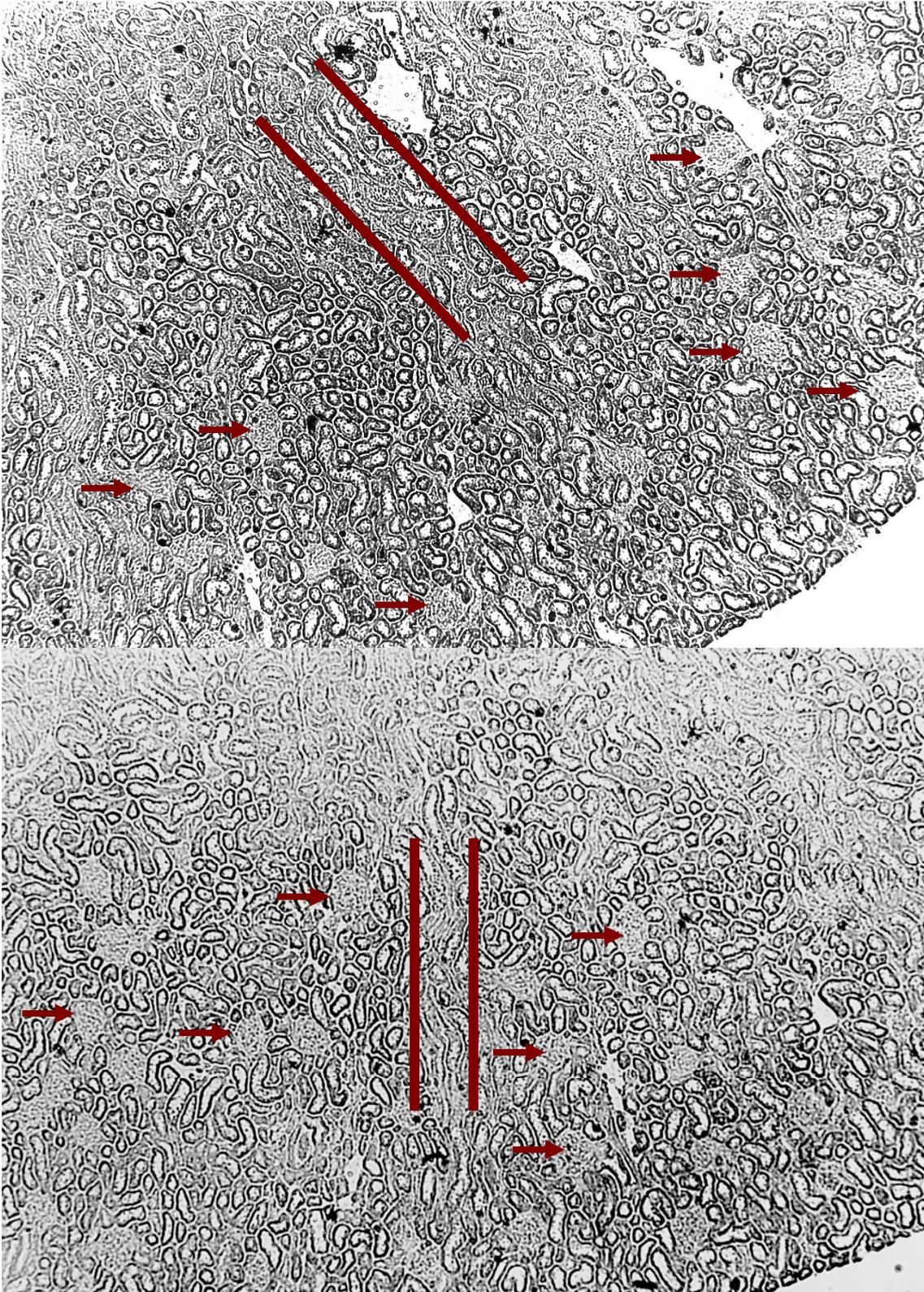


Abb 4.12. Nieren-Gefrierschnitte nach ISH mit α -cRNA-Kanadaptin Δ HindIII: Die Abbildung zeigt zwei Übersichtsbilder der ISH aus dem kortikalen Bereich der Rattenniere. Deutlich erkennbar ist die intensive ISH innerhalb der periglomerulären Areale, während eine ISH innerhalb der Markstreifen kaum stattgefunden hat. Repräsentative Nierenkörperchen sind durch kurze Pfeile, Markstreifen dagegen durch parallele Linien

markiert. Die schwarzen Punkte auf den Aufnahmen entsprechen unspezifischen Farbniederschlägen.

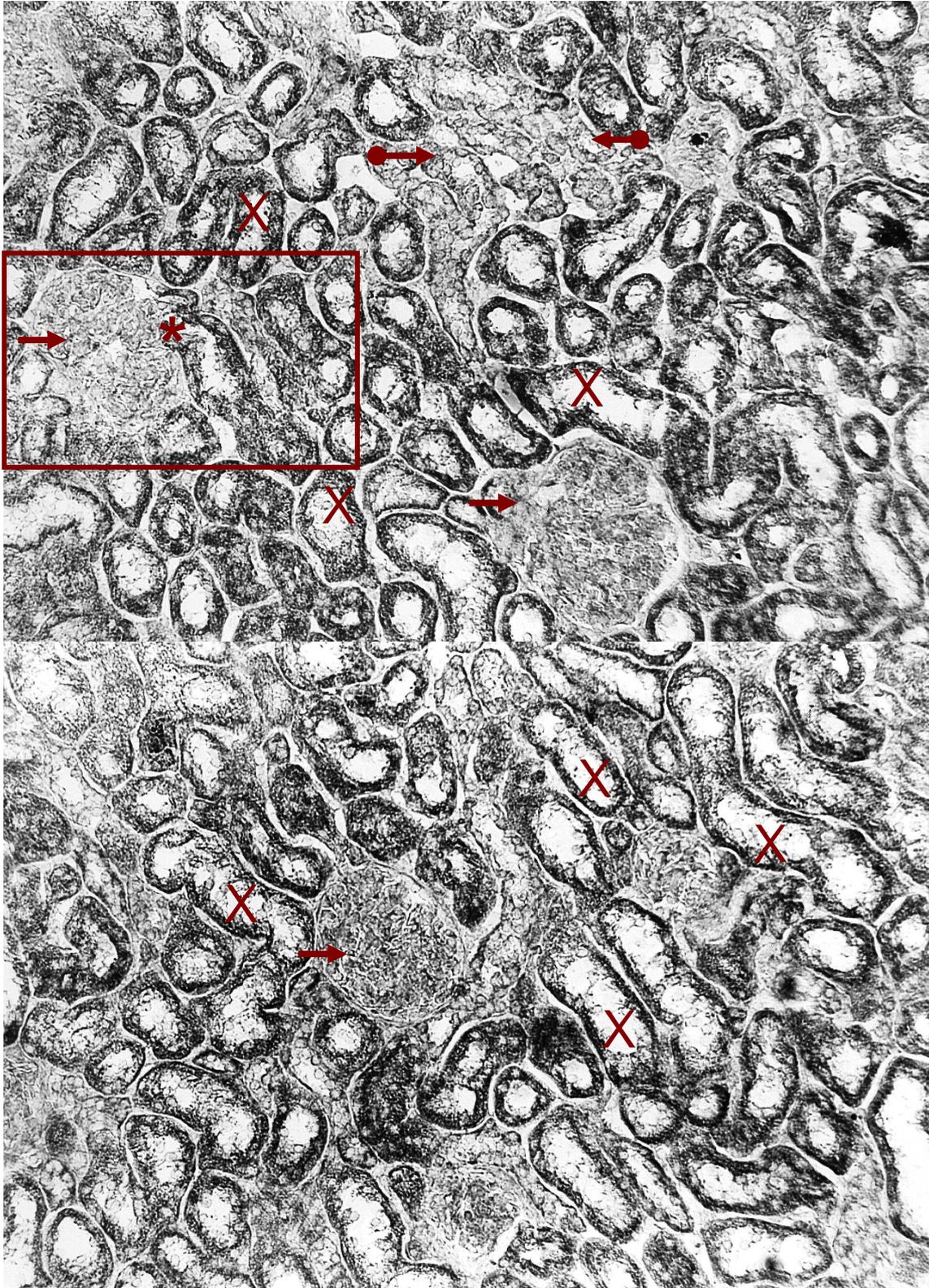


Abb. 4.13. Nieren-Gefrierschnitte nach ISH mit α -cRNA-Kanadaptin Δ HindIII: Die Abbildung zeigt zwei vergrößerte Ausschnitte der ISH aus dem kortikalen Bereich der Rattenniere.

Deutlich erkennbar ist die intensive ISH innerhalb der periglomerulären Areale. Die Nierenkörperchen (Pfeile) wurden durch die ISH nicht angefärbt. Jedoch zeigt sich unmittelbar am Harnpol eine kräftige ISH (Stern), die sich periglomerulär in den proximalen Tubulus fortsetzt (einige Abschnitte proximaler Tubuli sind beispielhaft mit X gekennzeichnet). Dazwischen liegen Tubulusanteile von weniger starker ISH, die distalen Tubuli entsprechen (Pfeile mit ausgefülltem Kreis beginnend). Die hellen Punkte in den Epithelzellen der Tubuli entsprechen den nicht angefärbten Zellkernen. Der umrandete Bereich im oberen Bild ist in Abb. 4.14. nochmals vergrößert dargestellt.

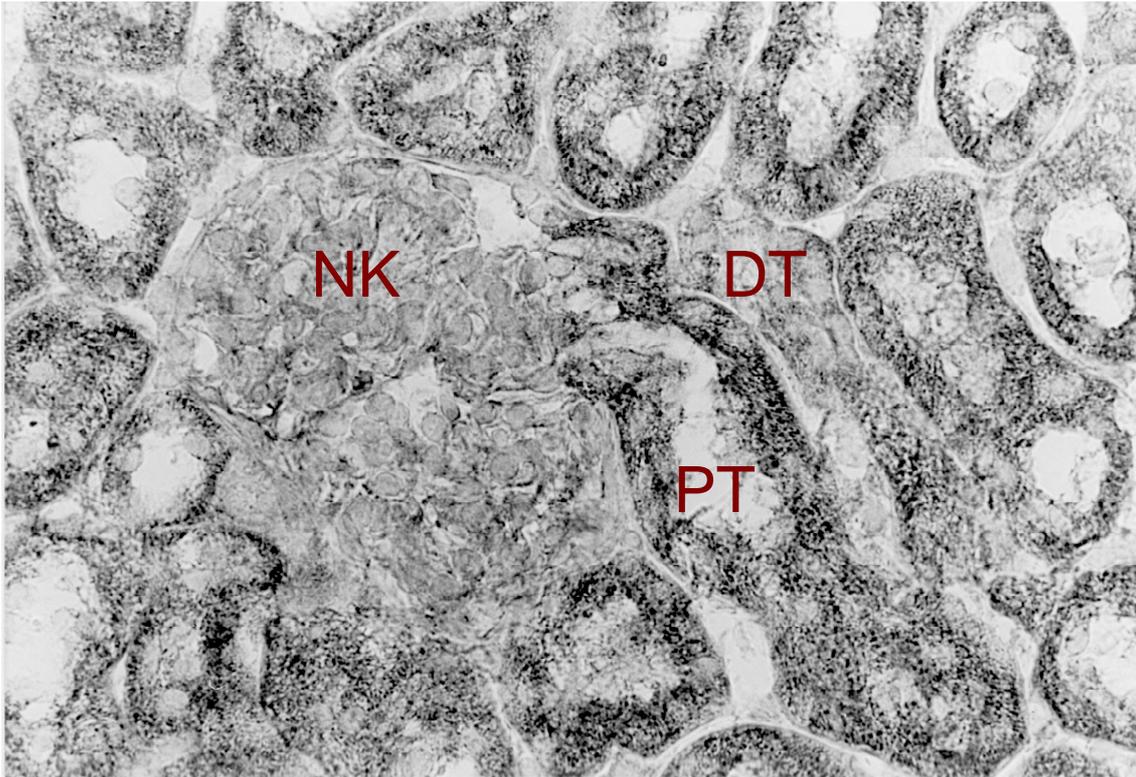


Abb. 4.14. Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 4.13.: Sehr deutlich ist die Intensitätsänderung der ISH beim Übergang des Nierenkörperchens in den proximalen Tubulus (Harnpol) erkennbar. Ebenfalls deutlich erkennbar ist die intensive periglomeruläre ISH. NK (Nierenkörperchen); PT (proximaler Tubulus); DT (distaler Tubulus).

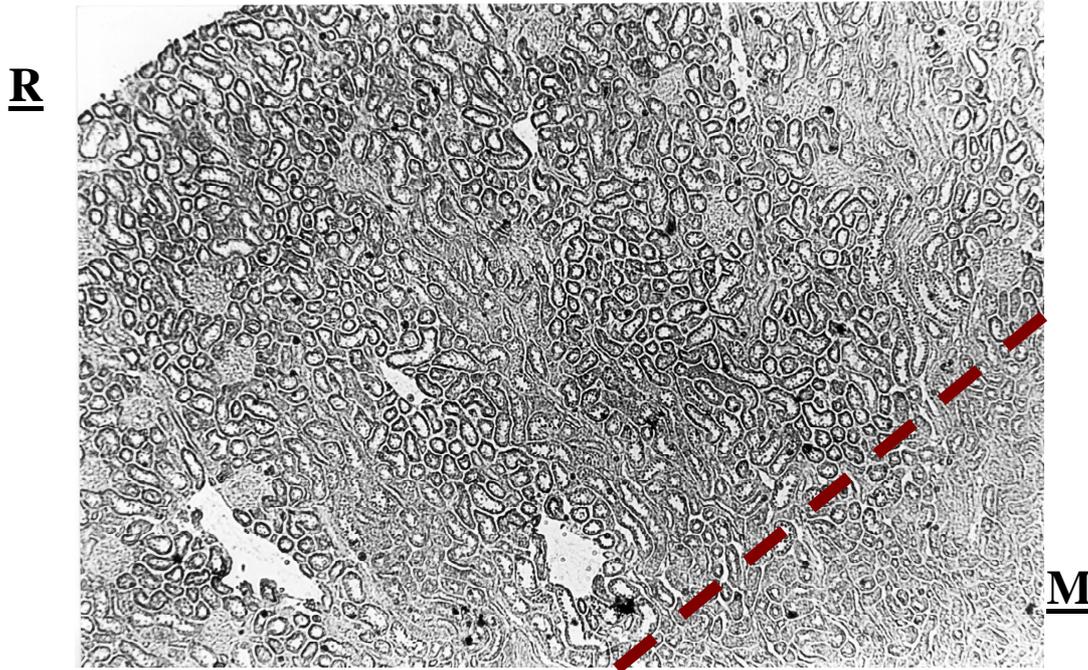


Abb 4.15. Darstellung der Mark-Rinden-Grenze in der Niere der Ratte: Dargestellt ist ein deutlicher Abfall der Signalintensität am Rinden-Mark-Übergang (gestrichelte Linie); R (Nierenrinde); M (Nierenmark).

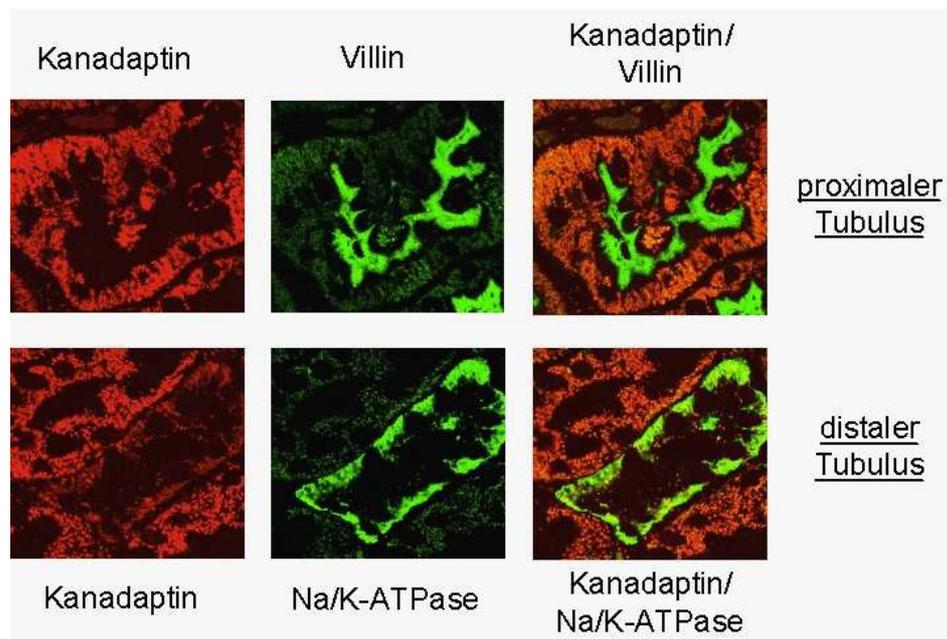


Abb 4.16. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an der Rattenniere von Dr. Stefan Hübner: Die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase ist spezifisch für Epithelzellen des Sammelrohrs, wohingegen Villin hauptsächlich Epithelzellen des proximalen Tubulus anfärbt. Gleichzeitige Inkubation der Kryoschnitte mit anti-Kanadaptin zeigt deutlich und Übereinstimmend mit den ISH-Untersuchungen, dass Kanadaptin hauptsächlich in Zellen des proximalen Tubulus vorkommt.

5. Diskussion

Bei der Suche nach Bindungspartnern des renalen Anionenaustauschers 1 (kAE1) mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Technik wurde im Jahre 1998 das bis dahin unbekannte Protein Kanadaptin identifiziert. Erste immunzytochemische Untersuchungen (Chen et al., 1998) an der Kaninchenniere ergaben, dass Kanadaptin in der Niere ausschließlich in den Epithelzellen des Sammelrohres vorkommt. In den A-Schaltzellen des Sammelrohres beschränkte sich eine Kolokalisation von Kanadaptin und kAE1 auf zytoplasmatische Vesikel (Golgi-Vesikel). Eine Kolokalisation beider Proteine wurde an der basolateralen Plasmamembran überraschenderweise nicht beobachtet. Somit wurde postuliert, dass Kanadaptin in A-Schaltzellen möglicherweise beim vesikulären Transport von kAE1 zur basolateralen Plasmamembran eine Rolle spielt. Hingegen wurde für die erythrozytäre Form von AE1 (eAE1) Glycopohrin A (GPA) identifiziert, das als Chaperone den Transport von eAE1 an die erythrozytäre Plasmamembran reguliert (Young et al., 2000). Coexpressionsexperimente in *Xenopus* Oozyten zeigten, dass GPA den Einbau von eAE1 in die Plasmamembran erhöht und damit den durch eAE1 vermittelten Cl⁻ Transport (Groves and Tanner, 1994; Groves and Tanner, 1992). Ähnliche Ergebnisse wurde auch in Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* erzielt (Groves et al., 1999). Allerdings wurde auch eine plasmalemmale Präsenz von eAE1 trotz Fehlen von GPA beobachtet (Casey et al., 1995; Timmer and Gunn, 1999). Somit scheint eAE1 in Erythrozyten sowohl abhängig als auch unabhängig von GPA zur Plasmamembran transloziert zu werden. Für kAE1 kann eine GPA-abhängige plasmalemmale Translokation nicht postuliert werden, da GPA in der Niere nicht exprimiert wird (Tanphaichitr et al., 1998). Da Kanadaptin auch in den nicht kAE1-exprimierenden Hauptzellen des Sammelrohres im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass Kanadaptin weitere von kAE1 unabhängige Funktionen ausübt. Neben den immunzytochemischen Befunden ergaben Northern-Blot Analysen, dass Kanadaptin auch außerhalb der Niere in zahlreichen Geweben gebildet wird. So wurde die mRNA des murinen Kanadaptins in Hoden, Lunge, Leber, Herz, Gehirn und Skelettmuskulatur detektiert (Chen et al., 1998).

Um erste Anhaltspunkte zu erhalten, welche Aufgaben Kanadaptin möglicherweise ausüben könnte, wurde mit Hilfe der cDNA Sequenz eine Datenbankanalyse mit PROSITE bzw. SMART (a simple modular architecture research tool) durchgeführt (Bairoch, 1993; Bairoch et al., 1997; Schultz et al., 1998; Schultz et al., 2000). Diese ergab, dass Kanadaptin ein Multidomänenprotein darstellt. So besitzt es u.a. drei Aminosäuresequenzen (NLS1, NLS2, bpNLS), die typische Bindemotive für Importine, d.h. NLS-Rezeptoren, darstellen, die beim Kerntransport eine bedeutende Rolle spielen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein GFP-Kanadaptin Fusionsprotein in transienten Transfektionsexperimenten in den Zellkern von MCDK-Zellen translozieren und dort akkumulieren kann (Hübner et al., 2002). Endogenes Kanadaptin wurde ebenfalls in verschiedenen epithelialen und nicht-epithelialen Zelllinien immunzytochemisch und biochemisch mit Hilfe subzellulärer Fraktionierungen nachgewiesen (Hübner et al., 2002). Aufgrund des karyophilen Charakters sollte nun herausgefunden werden, welche der postulierten NLSs für die Kernakkumulation von Kanadaptin verantwortlich ist. Hierzu wurde die NLS1 zuerst analysiert, da sie klassischen NLSs am stärksten ähnelte. Dazu wurde die NLS1 zwischen β -Galaktosidase und GFP inseriert, um so herauszufinden ob die NLS1 für einen Kernproteintransport ausreichend ist. Ein solches Fusionsprotein zeigte in MDCK Zellen eine sehr ausgeprägte nukleäre Akkumulation. Dagegen befand sich das entsprechende NLS1-defiziente, nur aus β -Galaktosidase und GFP bestehende Fusionsprotein ausschließlich zytoplasmatisch, da eine passive Diffusion in den Zellkern bei einer Größe des Fusionsproteins von über 400 kDa nicht erfolgen konnte. Durch eine Punktmutation in der NLS1 wurde schließlich die nukleäre Lokalisation von Kanadaptin nahezu aufgehoben (Hübner et al., 2002). Somit konnte die NLS1 als die Sequenz identifiziert werden, die für die nukleäre Lokalisation von Kanadaptin verantwortlich ist. Eine Quantifizierung der subzellulären Verteilung von Kanadaptin (nach Expression als GFP-Fusionsprotein in HeLa Zellen) mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie und einer daran anschließenden Berechnung des Verhältnisses der nukleären (n) zur zytoplasmatischen (c) GFP-Fluoreszenz (F), der sogenannte Fn/c-Wert, ergab, dass Kanadaptin eine um einen Faktor von mehr als 30 stärkere nukleäre Akkumulation aufweist als im Zytoplasma ($F_n/c > 30$). Die Mutation von NLS1 führte dagegen zu einer Umkehr der Verhältnisse, d.h. nukleären Exklusion

von Kanadaptin ($F_n/c < 0,7$) (Hübner, persönliche Mitteilung). Durch Kerntransportuntersuchungen und auf ELISA basierenden Bindungsstudien wurde zusätzlich gezeigt, dass die Translokalisierung von Kanadaptin durch die NLS-Rezeptoren Importin α und β erfolgt (Hübner et al., 2002). Dabei zeigte die NLS1 eine nur schwache Wechselwirkung mit dem NLS-Rezeptor Importin α , die jedoch in Gegenwart von Importin β signifikant verstärkt wurde (Hübner et al., 2002). Eine Punktmutation innerhalb der NLS1 reduzierte die Bindung zwischen Kanadaptin und dem Importin α/β Heterodimer deutlich.

Die Ergebnisse dieser Studien, die belegen, dass Kanadaptin über karyophile Eigenschaften verfügt, stehen im deutlichen Widerspruch zu den Ergebnissen von Chen et al. (1998), die eine rein zytosolische/Golgi-vesikuläre Lokalisation für Kanadaptin beschreiben. Möglicherweise könnten die Unterschiede darin begründet sein, dass unterschiedliche Antikörper gegen Kanadaptin verwendet wurden. Weiterhin muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sich die Ergebnisse der Untersuchungen, die mit Kaninchengewebe durchgeführt wurden, nicht ohne weiteres auf andere Spezies übertragen lassen. Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass Schaltzellen in der Niere der Ratte im Vergleich zum Kaninchen deutlich weniger kAE1-haltige Golgi-Vesikel enthalten (Madsen et al., 1992).

Weitere Studien ergaben Hinweise auf ein zusätzliches intramitochondriales Vorkommen von Kanadaptin in Epithelzellen des proximalen Tubulus, den Bergmann Glia, Astrozyten, Enterozyten und Hepatozyten (Hübner et al., 2003). Interessanterweise zeigten die Untersuchungen, dass die mitochondriale Färbung in kultivierten Zellen abhängig von der Fixationsmethode ist. Ähnliches wurde auch für den Glukokortikoid-Rezeptor beschrieben (Scheller et al. 2000). Aber auch durch subzelluläre Fraktionierungen und immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die intramitochondriale Lokalisation von Kanadaptin bestätigt werden (Hübner et al., 2003). Somit kann derzeit von einem zusätzlich mitochondrialen Vorkommen von Kanadaptin ausgegangen werden. Interessanterweise verfügt Kanadaptin über keine typische mitochondriale Signalsequenz und konnte auch nach exogener Expression

durch zytoplasmatische Retention (NLS1-mutiertes Kanadaptin) nicht innerhalb von Mitochondrien detektiert werden.

Neben der Eigenschaft nukleär und mitochondrial zu lokalisieren ist Kanadaptin auch in der Lage aus dem Zellkern wieder exportiert zu werden (Hübner et al., 2002). Hierfür scheinen Leucin-reiche Sequenzen eine Rolle zu spielen, die typischerweise von CRM1, einem Exportprotein, erkannt werden. (Ossareh-Nazari et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Fornerod et al., 1997). Eine durch die NetNes1.1 Software (www.cbs.dtu.dk/services/NetNES) identifizierte putative NES befindet sich in Kanadaptin an Position 414 (LLQEPELELEAAV).

Eine menschliche Isoform wurde erstmals im Jahre 2000 beschrieben. Gegenüber der murinen Isoform besitzt humanes Kanadaptin eine zusätzliche Extension von über 262 Aminosäuren am N-Terminus. Diese enthält eine Forkhead-Assoziations-(FHA) Domäne. Von Proteinen, die diese Domäne besitzen, ist bekannt, dass sie über karyophile Eigenschaften verfügen und DNA-assoziierende Funktionen ausüben (Allen et al., 1994; Murakami and Okayama, 1995). Beim Kanadaptin der Maus liegt der für die FHA-Domäne kodierende Abschnitt jedoch innerhalb des 5' nicht translatierten Bereiches und ist damit nicht Bestandteil des Proteins.

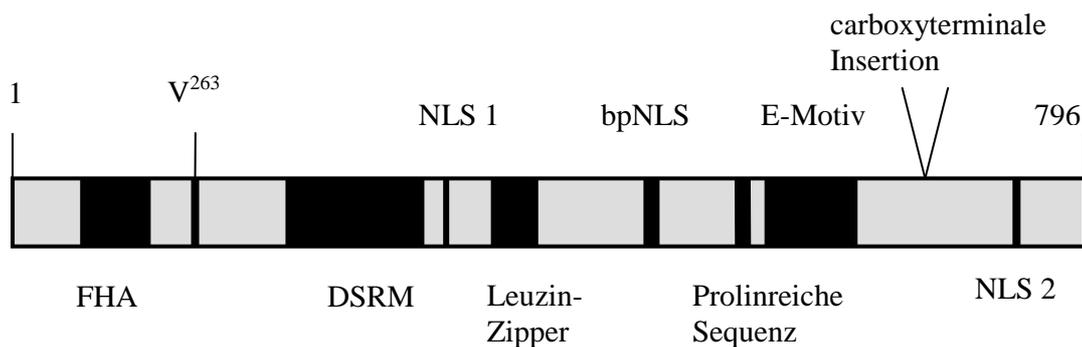


Abb 5.1.

Schematische Darstellung von humanem Kanadaptin

Humanes Kanadaptin zeigt bezüglich der Sequenz eine ca. 95%ige Homologie zum Kanadaptin der Maus. Innerhalb der aminoterminalen Extension liegt die Forkhead-Assoziations-Domäne(FHA). Während das Kanadaptin der Maus mit der Aminosäure Methionin beginnt, steht an der homologen Position 263 ein Valin (V). Die P-Schleife des murinen Kanadaptins fehlt (siehe Abb.1.4.). Nahe der NLS 2 befindet sich eine carboxyterminale Insertion von 25 Aminosäuren.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression eines für humanes Kanadaptin kodierendes cDNA-Fragment in *E.-coli* einen SOS-Response auslösen kann. Von solchen SOS-auslösenden Proteinen ist bekannt, dass diese an DNA-metabolischen Prozessen beteiligt sind (Perkins et al., 1999).

Kanadaptin scheint also sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien eukaryotischer Zellen vorzukommen und möglicherweise über Fähigkeiten der DNA-Interaktion zu verfügen. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation ergaben für humanes Kanadaptin eine ebenfalls stark nukleäre Akkumulation (Bahr, 2003; Kittanakom et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Proteinebene gezeigt, dass Kanadaptin außer in den Nieren noch in vielen weiteren Geweben gebildet wird. Western-Blot Analysen ergaben ein starkes Vorkommen von Kanadaptin in Leber, Kleinhirn, Prosencephalon, Mesencephalon, Medulla oblongata, Niere und Herz. Ein schwaches Signal fand sich im Lungengewebe, nur angedeutet war Kanadaptin auch im Lysat der Milz nachweisbar. Im Lysat der Skelettmuskulatur ließ sich Kanadaptin dagegen überhaupt nicht nachweisen. Diese Ergebnisse gehen weitestgehend konform mit den Aussagen von Chen et al. (1998), die bereits die Expression von Kanadaptin mit Hilfe der Nother-Blot Analyse im Hoden, Lunge, Leber, Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur und Niere der Maus nachweisen konnten. In weiteren Experimenten wurde in dieser Arbeit auch die Verteilung innerhalb der Niere untersucht. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte von der Rinde, Mark und Papille der Kaninchenniere hergestellt und einer Western-Blot Analyse unterworfen. Die höchste Konzentration von Kanadaptin wurde in der Papille gefunden, die besonders reich an Sammelrohren ist. Geringere Konzentrationen wurden im Nierenmark und der Nierenrinde nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Ergebnissen, die mit Gesamtextrakten aus der Rattenniere erzielt wurden (Hübner et al., 2003). Hier wurde die höchste Konzentration von Kanadaptin in der Rinde detektiert, mit geringeren Proteinkonzentrationen im Mark und in den Papillen. Die differenten Ergebnisse können wiederum darauf beruhen, dass unterschiedliche Gewebe und unterschiedliche Antikörper zum Einsatz kamen.

Ein Nachweis von Kanadaptin konnte auch für viele Zellkulturlinien geführt werden. Sowohl mittels Western-Blot Analyse, als auch mittels RT-PCR konnte die cDNA von Kanadaptin in NT2/D1 (embryonales Teratokarzinom mit zentralnervösen Vorläuferzellen), U373 (humanes Glioblastom/Astrozytom), L-M(TK-) (Fibroblasten der Maus), DLD-1 (Adenokarzinom des humanen Kolons), MCF-7 (humanes Adenokarzinom der Mamma), HEK-293 (humane embryonale Nierenzellen), SW-480 (humanes Adenokarzinom des Kolons) und Hep-G2 (humanes hepatozelluläres Karzinom) nachgewiesen werden.

Eine Datenbankanalyse von Expressed-Sequence-Tags ergab darüber hinaus, dass erste Kanadaptin-spezifische Sequenzen bereits im Zweizellstadium der Maus nachweisbar sind. Mittels Western-Blot konnte ein Auftreten von signifikanten Kanadaptinmengen ab dem 9. Embryonaltag bewiesen werden (Bahr, 2003).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der nicht radioaktiven *in situ*-Hybridisierung (ISH) die Kanadaptin-mRNA in der Rattenniere hinsichtlich ihrer innerorganischen Verteilung untersucht. Hierbei wurde das stärkste ISH-Signal im Rindenbereich und hier ganz besonders periglomerulär in hochprismatischen Zellen detektiert. Das ISH-Signal konnte den Zellen des proximalen Tubulus zugeordnet werden. So waren Zellen des juxtaglomerulären Teils der Pars convoluta des proximalen Tubulus (Harnpol) ISH-positiv (siehe Abb. 4.14). Im Nierenmark, in den Markstrahlen und in einigen periglomerulären, niedrigprismatischen Zellen der Rinde hingegen war die ISH deutlich schwächer. Die Ergebnisse sprechen für ein Vorkommen von Kanadaptin hauptsächlich in epithelialen Zellen des proximalen und weniger des distalen Tubulus oder des Sammelrohres. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Untersuchungen von Hübner et al. (2003), die im Kortex der Rattenniere Kanadaptin in Zellen nachweisen konnten, die immunzytochemisch anti-Villin positiv waren (Zellen des proximalen Tubulus), wobei Na⁺/K⁺-ATPase positive Zellen (Zellen des distalen Tubulus) negativ für Kanadaptin waren. Wie bereits erwähnt zeigte sich in der Western-Blot Analyse die höchste Konzentration von Kanadaptin ebenfalls in der Nierenrinde. Im Gegensatz hierzu wurde von Chen et al. (1998) postuliert, dass Kanadaptin in der

Kaninchenniere ausschließlich in den Sammelrohren vorkommt. Diesbezüglich wurde von Hübner et al. (2003) gezeigt, dass Kanadaptin in der Niere des Kaninchens immunzytochemisch sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus vorkommt. Dabei zeigten beide Tubulusabschnitte des Nephrons nicht voneinander unterscheidbare Intensitäten in der Immunfärbung. Auch hier sind die unterschiedlichen Antikörper, die bei den Experimenten Verwendung fanden, eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse.

Abschließend kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch immer nicht die Frage beantwortet werden, welche Funktion(en) Kanadaptin in der Zelle bzw. im Zellkern bzw. in Mitochondrien innehat. Der von Chen et al. (1998) postulierte Einfluss von Kanadaptin auf das Targeting Kanadaptin-haltiger Golgi-Vesikel zur basolateralen Membran Typ A-interkalierender Zellen gilt als eher unwahrscheinlich. Dies wird umso mehr durch Untersuchungen von Kittanakom et al. (2004) belegt, die zeigen, dass humanes Kanadaptin, obwohl zu der murinen Isoform ca. 95% identisch (ohne Berücksichtigung der N- und C-terminalen Extension/Insertion), nicht in der Lage ist, kAE1 aus *Xenopus* Oozyten weder durch Immunopräzipitation noch durch Affinitätschromatographie zu isolieren. Ein vermehrter Einbau von kAE1 in die Oozytenmembran infolge der Koexpression des humanen Kanadaptins wurde ebenfalls nicht beobachtet (Kittanakom et al., 2004). Schließlich zeigten Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen keinerlei Interaktionen zwischen den humanen Proteinen kAE1 und Kanadaptin (Wongthida P. et al., 2006).

5.1. Zusammenfassung und Ausblick

Kanadaptin ist ein Multidomänenprotein, das in der Ratte in nahezu allen Geweben vorkommt und über kernimport- und kernexport-aktive Sequenzen verfügt. Die kernimport-aktive Sequenz konnte der NLS1 (¹⁸⁹RKRK) zugeordnet werden. Die Kernexportaktivität wird möglicherweise durch eine Leucin-reiche Domäne (⁴¹⁴LLQEPELELEAAV) vermittelt. Zusätzlich ist Kanadaptin in Mitochondrien nachweisbar. In humanen Zellen wird eine Isoform gebildet, die über eine zusätzliche aminoterminaler FHA-Domäne verfügt. Solche Proteine zeichnen sich u.a durch DNA-

bindende Eigenschaften aus (Murakami and Okayama, 1995; Allen et al., 1994; Durocher and Jackson, 2002). Dies erklärt auch die nukleäre Retention von Kanadaptin nach Verlust Zellkernmembranintegrität (Hübner et al, 2002) Für eine nukleäre Funktion spricht auch, dass infolge der Expression eines Kanadaptin-cDNA-Fragments eine unter diesen Umständen (d.h. infolge der Expression DNA-bindender/modifizierender Proteine) spezifische SOS-Antwort in *E. coli* ausgelöst werden kann (Perkins et al., 1999). Die Ergebnisse deuten somit eindeutig daraufhin, dass Kanadaptin an nukleären und/oder nukleinsäureabhängigen Prozessen beteiligt ist. In der Niere wurde mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung Kanadaptin hauptsächlich in proximalen Tubuluszellen detektiert. Insgesamt scheint eine Interaktion zwischen Kanadaptin und kAE1 inzwischen immer unwahrscheinlicher. Schließlich ließ sich eine Interaktion zwischen Kanadaptin und kAE1 im Hefe-2-Hybrid-System nicht mehr reproduzieren (Hübner, persönliche Mitteilung) (Wongthida P. et al., 2006). Auch in embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) konnte keine Interaktion zwischen humanem Kanadaptin und kAE1 nachgewiesen werden (Kittanakom et al., 2004). Welche Funktionen Kanadaptin intrazellulär ausübt bleibt weiterhin enigmatisch und muss in zukünftigen Untersuchungen herausgefunden werden.

6. Literaturverzeichnis

Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Sali A, Rout MP (2007) The molecular architecture of the nuclear pore complex. Nature 450: 695-701.

Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ (1994) The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. Genes Dev 8: 2401-2415.

Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK (2002) The AE gene family of Cl/HCO₃- exchangers. J Nephrol 15 Suppl 5: S41-S53.

Alper SL, Rossmann H, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Shmukler BE, Seidler U (1999) Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. Am J Physiol 277: G321-G332.

Alper SL, Stuart-Tilley A, Simmons CF, Brown D, Drenckhahn D (1994) The fodrin-ankyrin cytoskeleton of choroid plexus preferentially colocalizes with apical Na⁺K⁽⁺⁾-ATPase rather than with basolateral anion exchanger AE2. J Clin Invest 93: 1430-1438.

Arnautov A, Dasso M (2003) The Ran GTPase regulates kinetochore function. Dev Cell 5: 99-111.

Bagga A, Jain Y, Srivastava RN, Bhuyan UN (1993) Renal tubular acidosis preceding systemic lupus erythematosus. Pediatr Nephrol 7: 735-736.

Bahr, C. Untersuchungen zur Expression und subzellulären Lokalisation von Isoformen des Adapterproteins Kanadaptin. 2003.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Bairoch A (1993) The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. Nucleic Acids Res 21: 3097-3103.

Bairoch A, Bucher P, Hofmann K (1997) The PROSITE database, its status in 1997. Nucleic Acids Res 25: 217-221.

Bischoff FR, Ponstingl H (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. Nature 354: 80-82.

Bonner WM (1975a) Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. J Cell Biol 64: 421-430.

Bonner WM (1975b) Protein migration into nuclei. II. Frog oocyte nuclei accumulate a class of microinjected oocyte nuclear proteins and exclude a class of microinjected oocyte cytoplasmic proteins. J Cell Biol 64: 431-437.

Booher RN, Alfa CE, Hyams JS, Beach DH (1989) The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. Cell 58: 485-497.

Brosius FC, III, Pisoni RL, Cao X, Deshmukh G, Yannoukakos D, Stuart-Tilley AK, Haller C, Alper SL (1997) AE anion exchanger mRNA and protein expression in vascular smooth muscle cells, aorta, and renal microvessels. Am J Physiol 273: F1039-F1047.

Bruce LJ, Tanner MJ (1999) Erythroid band 3 variants and disease. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 12: 637-654.

Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 112: 195-203.

Casey JR, Ding Y, Kopito RR (1995) The role of cysteine residues in the erythrocyte plasma membrane anion exchange protein, AE1. J Biol Chem 270: 8521-8527.

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

Chen J, Vijayakumar S, Li X, Al Awqati Q (1998) Kanadaptin is a protein that interacts with the kidney but not the erythroid form of band 3. J Biol Chem 273: 1038-1043.

Ciciarello M, Mangiacasale R, Thibier C, Guarguaglini G, Marchetti E, Di Fiore B, Lavia P (2004) Importin beta is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells. J Cell Sci 117: 6511-6522.

Cogan MG (1982) Disorders of proximal nephron function. Am J Med 72: 275-288.

Cohen GB, Ren R, Baltimore D (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. Cell 80: 237-248.

Ding Y, Casey JR, Kopito RR (1994) The major kidney AE1 isoform does not bind ankyrin (Ank1) in vitro. An essential role for the 79 NH2-terminal amino acid residues of band 3. J Biol Chem 269: 32201-32208.

Drenckhahn D, Schluter K, Allen DP, Bennett V (1985) Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. Science 230: 1287-1289.

Durocher D, Jackson SP (2002) The FHA domain. FEBS Lett 513: 58-66.

Fahrenkrog B, Aebi U (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 757-766.

Fanara P, Hodel MR, Corbett AH, Hodel AE (2000) Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. J Biol Chem 275: 21218-21223.

FELDHERR CM (1962) The nuclear annuli as pathways for nucleocytoplasmic exchanges. J Cell Biol 14: 65-72.

Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. Cell 82: 475-483.

Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell 90: 1051-1060.

Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. Nature 390: 308-311.

Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A 63: 378-383.

Gasiorowski JZ, Dean DA (2003) Mechanisms of nuclear transport and interventions. Adv Drug Deliv Rev 55: 703-716.

Gorlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR (1996) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. EMBO J 15: 5584-5594.

Groves JD, Parker MD, Askin D, Falson P, le Maire M, Tanner MJ (1999) Heterologous expression of the red-cell anion exchanger (band 3; AE1). Biochem Soc Trans 27: 917-923.

*Groves JD, Tanner MJ (1992) Glycophorin A facilitates the expression of human band 3-mediated anion transport in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem 267: 22163-22170.*

*Groves JD, Tanner MJ (1994) The effects of glycophorin A on the expression of the human red cell anion transporter (band 3) in *Xenopus* oocytes. J Membr Biol 140: 81-88.*

*Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580.*

Huber S, Asan E, Jöns T, Kerscher C, Püschel B, Drenckhahn D (1999) Expression of rat kidney anion exchanger 1 in type A intercalated cells in metabolic acidosis and alkalosis. Am J Physiol 277: F841-F849.

Hübner S, Bahr C, Gößmann H, Efthymiadis A, Drenckhahn D (2003) Mitochondrial and nuclear localization of kanadaptin. Eur J Cell Biol 82: 240-252.

Hübner S, Jans DA, Xiao CY, John AP, Drenckhahn D (2002) Signal- and importin-dependent nuclear targeting of the kidney anion exchanger 1-binding protein kanadaptin. Biochem J 361: 287-296.

Jakel S, Gorlich D (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. EMBO J 17: 4491-4502.

Jans DA (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. Biochem J 311 (Pt 3): 705-716.

Jans DA, Hübner S (1996) Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. Physiol Rev 76: 651-685.

Jöns T, Warrings B, Jöns A, Drenckhahn D (1994) Basolateral localization of anion exchanger 2 (AE2) and actin in acid-secreting (parietal) cells of the human stomach. Histochemistry 102: 255-263.

Kalab P, Pralle A, Isacoff EY, Heald R, Weis K (2006) Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. Nature 440: 697-701.

Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. Nature 311: 33-38.

Karet FE, Gainza FJ, Gyory AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJ, Nayir A, Alpay H, Santos F, Hulton SA, Bakkaloglu A, Ozen S, Cunningham MJ, di Pietro A, Walker WG, Lifton RP (1998) Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 6337-6342.

Kim J, Kim YH, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM (1999) Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. J Am Soc Nephrol 10: 1-12.

Kittanakom S, Keskanokwong T, Akkarapatumwong V, Yenchitsomanus PT, Reithmeier RA (2004) Human kanadaplin and kidney anion exchanger 1 (kAE1) do not interact in transfected HEK 293 cells. Mol Membr Biol 21: 395-402.

Kobayashi S, Morgans CW, Casey JR, Kopito RR (1994) AE3 anion exchanger isoforms in the vertebrate retina: developmental regulation and differential expression in neurons and glia. J Neurosci 14: 6266-6279.

Kollert-Jöns A, Wagner S, Hübner S, Appelhans H, Drenckhahn D (1993) Anion exchanger 1 in human kidney and oncocyoma differs from erythroid AE1 in its NH₂ terminus. Am J Physiol 265: F813-F821.

Kopito RR (1990) Molecular biology of the anion exchanger gene family. Int Rev Cytol 123: 177-199.

Kudrycki KE, Shull GE (1993) Rat kidney band 3 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger mRNA is transcribed from an alternative promoter. Am J Physiol 264: F540-F547.

Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Gorlich D (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. Cell 90: 1061-1071.

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science 240: 1759-1764.

Löffler G, Petrides P Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage 1998.

Madsen KM, Kim J, Tisher CC (1992) Intracellular band 3 immunostaining in type A intercalated cells of rabbit kidney. Am J Physiol 262: F1015-F1022.

Michaely P, Bennett V (1993) The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. J Biol Chem 268: 22703-22709.

Muhlhausser P, Muller EC, Otto A, Kutay U (2001) Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. EMBO Rep 2: 690-696.

Mukaigawa J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. J Virol 65: 245-253.

Murakami H, Okayama H (1995) A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. Nature 374: 817-819.

Ossareh-Nazari B, Bachelerie F, Dargemont C (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. Science 278: 141-144.

Pante N, Kann M (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. Mol Biol Cell 13: 425-434.

Parker MD, Ourmozdi EP, Tanner MJ (2001) Human BTR1, a new bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney. Biochem Biophys Res Commun 282: 1103-1109.

Pemberton LF, Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. Traffic 6: 187-198.

Perkins EL, Sterling JF, Hashem VI, Resnick MA (1999) Yeast and human genes that affect the Escherichia coli SOS response. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 2204-2209.

Pollard VW, Michael WM, Nakielny S, Siomi MC, Wang F, Dreyfuss G (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. Cell 86: 985-994.

Renz-Polster H, Braun J Innere Medizin. erste Auflage 1999.

Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Gorlich D (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. EMBO J 17: 6587-6598.

Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell 64: 615-623.

Romero MF, Fulton CM, Boron WF (2004) The SLC4 family of HCO³⁻ transporters. Pflugers Arch 447: 495-509.

Rosenblum JS, Pemberton LF, Bonifaci N, Blobel G (1998) Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. J Cell Biol 143: 887-899.

Rothstein M, Obialo C, Hruska KA (1990) Renal tubular acidosis. Endocrinol Metab Clin North Am 19: 869-887.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Salinovich O, Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 156: 341-347.

Sambrook J, Russel DW Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res 28: 231-234.

Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 5857-5864.

Shen T, Liu Y, Cseresnyes Z, Hawkins A, Randall WR, Schneider MF (2006) Activity- and calcineurin-independent nuclear shuttling of NFATc1, but not NFATc3, in adult skeletal muscle fibers. Mol Biol Cell 17: 1570-1582.

Siamopoulos KC, Elisaf M, Drosos AA, Mavridis AA, Moutsopoulos HM (1992) Renal tubular acidosis in primary Sjogren's syndrome. Clin Rheumatol 11: 226-230.

Siomi H, Dreyfuss G (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. Curr Opin Genet Dev 7: 345-353.

Sorg G, Stamminger T (1999) Mapping of nuclear localization signals by simultaneous fusion to green fluorescent protein and to beta-galactosidase. Biotechniques 26: 858-862.

Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. Cell 90: 1041-1050.

Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D, Aebi U (2003) Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. J Mol Biol 328: 119-130.

Suntharalingam M, Wente SR (2003) Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. Dev Cell 4: 775-789.

Tanner MJ (1997) The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review). Mol Membr Biol 14: 155-165.

Tanphaichitr VS, Sumboonnanonda A, Ideguchi H, Shayakul C, Brugnara C, Takao M, Veerakul G, Alper SL (1998) Novel AE1 mutations in recessive distal renal tubular acidosis. Loss-of-function is rescued by glycophorin A. J Clin Invest 102: 2173-2179.

Timmer RT, Gunn RB (1999) Inducible expression of erythrocyte band 3 protein. Am J Physiol 276: C66-C75.

Toye AM, Banting G, Tanner MJ (2004) Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). J Cell Sci 117: 1399-1410.

Tsuganezawa H, Kobayashi K, Iyori M, Araki T, Koizumi A, Watanabe S, Kaneko A, Fukao T, Monkawa T, Yoshida T, Kim DK, Kanai Y, Endou H, Hayashi M, Saruta T (2001) A new member of the HCO₃⁻ transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. J Biol Chem 276: 8180-8189.

Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. Science 246: 911-916.

Wall SM (2005) Recent advances in our understanding of intercalated cells. Curr Opin Nephrol Hypertens 14: 480-484.

Walter CA, Humphrey RM, Adair GM, Nairn RS (1991) Characterization of Chinese hamster ovary cells stably transformed by a plasmid with an inducible APRT gene. Plasmid 25: 208-216.

Wang CC, Moriyama R, Lombardo CR, Low PS (1995a) Partial characterization of the cytoplasmic domain of human kidney band 3. J Biol Chem 270: 17892-17897.

Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL, Taylor SS (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. J Biol Chem 269: 32214-32220.

Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. Cell 82: 463-473.

Wongthida P., Akkarapatumwong V., Limjindaporn T., Kittanakom S., Keskanokwong T., Eurwilaichitr L., Yenichitsomanus P. (2006) Analysis of the interaction between human kidney anion exchanger 1 and kanadaplin using yeast two-hybrid systems. Genetics and Molecular Biology 29: 14-22.

Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez HA, Fey P, Duyk G, Alper SL (1994) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. Circ Res 75: 603-614.

Young MT, Beckmann R, Toye AM, Tanner MJ (2000) Red-cell glycophorin A-band 3 interactions associated with the movement of band 3 to the cell surface. Biochem J 350 Pt 1: 53-60.

7. Bildverzeichnis

1. Einleitung

| | | |
|-----------|---|----|
| Abb. 1.1. | Schematische Darstellung eines Nephrons | 2 |
| Abb 1.2. | Schematische Darstellung der Schaltzellen | 6 |
| Abb 1.3. | Verbindung der Filamente des Zytoskeletts mit eAE1 | 8 |
| Abb 1.4. | Das Multidomänenprotein Kanadaptin in einer schematischen Darstellung | 11 |
| Abb 1.5. | Schematische Darstellung eines elektronenmikroskopischen Blicks in den Zellkern | 13 |
| Abb 1.6. | Überblick über die Transportmöglichkeiten von Proteinen durch den NPC | 16 |

2. Material

| | | |
|----------|---|----|
| Abb 2.1. | Schematische Darstellung des Vektors pHM829 | 24 |
|----------|---|----|

3. Methoden

4. Ergebnisse

| | | |
|----------|---|----|
| Abb 4.1. | Gelelektrophoretische Analyse des mit <i>XbaI</i> -inkubierten Vektors pHM829 | 47 |
| Abb 4.2. | Gelelektrophoretische Analyse putativer pHM829-NLS1-Plasmide | 49 |

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 4.3. | Gelelektrophoretische Analyse putativer pHM829-NLS1-Plasmide nach <i>XbaI</i> -Behandlung | 50 |
| Abb 4.4. | Gelelektrophoretische Analyse der Amplifikate nach PCR putativer pHM829-NLS1-Plasmide | 51 |
| Abb. 4.5. | Subzelluläre Lokalisation von β -Galaktosidase-NLS1-GFP in MDCK-Zellen | 52 |
| Abb 4.6. | Western Blot-Analyse verschiedener Rattengewebe mit anti-Kanadaptin | 53 |
| Abb 4.7. | Analytische Gelelektrophorese eines Kanadaptin-spezifischen RT-PCR-Ansatzes | 55 |
| Abb 4.8. | Gelelektrophoretische Analyse des mit <i>HindIII</i> - bzw. <i>PstI</i> -behandelten Transkriptionsvektors pKS-Kanadaptin | 56 |
| Abb 4.9. | Schematische Darstellung der Transkriptionsvektoren | 57 |
| Abb 4.10. | Gelelektrophoretische Analyse der antisense cRNA-Sonden | 58 |
| Abb 4.11. | Nieren-Gefrierschnitte nach ISH mit s-cRNA-Kanadaptin | 60 |
| Abb 4.12. | Nieren-Gefrierschnitte nach ISH mit a-cRNA-Kanadaptin Δ <i>HindIII</i> | 61 |
| Abb. 4.13. | Nieren-Gefrierschnitte nach ISH mit a-cRNA-Kanadaptin Δ <i>HindIII</i> | 62 |
| Abb. 4.14. | Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 4.13. | 63 |
| Abb 4.15. | Darstellung der Mark-Rinden-Grenze in der Niere der Ratte | 64 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Abb 4.16. | Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen von Dr. Stefan Hübner | 64 |
|-----------|---|----|

5. Diskussion

| | | |
|----------|---|----|
| Abb 5.1. | Schematische Darstellung von humanem Kanadaptin | 68 |
|----------|---|----|

Danksagung

Bei Prof. Dr. D. Drenckhahn möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und Unterstützung der Arbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Stefan Hübner gilt mein besonderer Dank, dessen großes Engagement, geduldige Anleitung und umsichtige Planung die Fertigstellung der Arbeit ermöglichte. Auch seiner Frau Dr. Athina Hübner gilt mein Dank für viele konstruktive Anregungen im Labor.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen MTAs des Anatomischen Instituts insbesondere Frau Erna Kleinschroth, Frau Martina Koch und Frau Karina Hilpert, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Chris Bahr sowie bei den medizinischen Doktorandenkollegen Dr. Tobias Langenhan, Dr. Stephan Rath, Dr. Michael Zeller, Dr. Johannes Wiegand und Dr. Sophia Meier-Stiegen.

Nicht zuletzt geht mein besonderer Dank an meine Freundin Dr. Vera Baumeister und an meine Familie, die mir in schwierigen Zeiten immer zur Seite standen.

Lebenslauf

Name: Holger Stefan Gößmann
Geburtsdatum: 07.04.1973
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

09/79-07/83 Grundsule in Würzburg
09/83-07/87 Deutschhaus-Gymnasium, Würzburg
09/87-07/90 Staatl. Realschule Höchberg,
Abschluss: mittlere Reife
09/95-07/97 Berufsoberschule Würzburg,
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
*Stipendium des Freistaats Bayern nach dem
bayerischen Begabtenförderungsgesetz*

Berufsausbildung:

09/90-07/93 Ausbildung zum Datenverarbeitungskaufmann

Universitäre Ausbildung:

11/97 – 05/04 Studium der Humanmedizin an der Universität
Würzburg
16.09.99 ärztliche Vorprüfung
29.08.00 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.04.03 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.05.04 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeiten:

09/93-03/95 Angestellter bei Theo Kranz Games, Würzburg
07/97-10/97 stellv. Chefredakteur des Magazins „Fun Generation“

09/04-02/06 AIP in der Chirurgischen Klinik des Klinikums
Konstanz; zum 1.10.04 Übernahme in das
Assistenzarztverhältnis

Seit 3/06 Assistenzarzt am Institut für Röntgendiagnostik der
Universität Regensburg