

Aus dem Physiologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Physiologie I  
Vorstand: Professor Dr. med. S. Silbernagl

**Suche nach Interaktionspartnern mit dem ATP-abhängigen Kaliumkanal  
der Niere, ROMK, durch „Yeast-Two-Hybrid“-Screening**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Marcel Philipp Roos  
aus  
Rüsselsheim

Würzburg, Juni 2004

Referent: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Koreferent: Prof. Dr. med. C. Wanner

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2005

Der Promovend ist Arzt

Gewidmet meiner Familie, meinen Großeltern  
und Darren Serebro

Halte dich dazu an, alles, was dir von Menschen an Gutem  
begegnet, nach seinem wahren Werten zu messen.  
Nichts von dem, was dir widerfährt, ist selbstverständlich.

*Albert Schweitzer, „vom Sinn des Lebens“*

## **0.0 Inhaltsverzeichnis**

<b><u>1.0. Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1. Physiologische Rolle von Kalium	1
1.2. Die Rolle der Niere für die Kaliumhomöostase	1
1.3. Kaliumtransport entlang des Nephron	2
1.4. Kaliumkanäle der Niere und ihre Funktion	2
1.5. Der ATP-abhängige einwärts gleichrichtende Kaliumkanal ROMK	3
1.5.1. Kanalisformen und ihre Lokalisation	3
1.5.2. Struktur von ROMK	4
1.5.3. Regulation von ROMK	5
1.5.4. Interaktion mit anderen Proteinen	7
1.6. Protein-Protein-Interaktionen	8
1.6.1. PDZ-Domäne	9
1.7. Aufgabenstellung	10
<b><u>2.0. Material und Methoden</u></b>	<b>11</b>
2.1. Material	11
2.1.1. Chemikalien	11
2.1.2. Geräte	14
2.1.3. Verbrauchsmaterial	15
2.2. Molekularbiologie	15
2.2.1. Bakterienstämme	15
2.2.2. Hefestämme	15
2.2.3. Zellen und Zellkultur	15
2.2.4. Vektoren	15
2.2.5. Enzyme und Puffer	16
2.2.6. Oligonukleotide	16
2.2.7. Größenmarker	17
2.2.8. Antikörper	17
2.2.9. Kit-Systeme	17
2.3. Verwendete Lösungen und Substanzen	18
2.3.1. DNA-Präparation, Ligation, Klonierung	18
2.3.2. „Yeast-Two-Hybrid“-Screen	18

2.3.2.1.Hefezellen-Versuchslösungen und Nährmedien	18
2.3.2.2.Bakterien-Versuchslösungen und Nährmedien	21
2.3.3. GST-ROMK-Pulldown-Experimente	21
2.3.4. Immunfluoreszenz	23
2.4. Methoden	23
2.5. Technik der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode	23
2.6. Ablauf des „Yeast-Two-Hybrid“ Screens	26
2.6.1. Konstruktion der Köder-cDNA	26
2.6.2. Transformation der Köder-cDNA in E. coli	28
2.6.2.1.DNA-Isolierung aus Bakterien	28
2.6.3. Transformation der Köder-cDNA in die Hefezelle	28
2.6.4. Überprüfung der Autoaktivierung des Köderproteins	29
2.6.5. Extraktion des ROMK-Gal4BD-Fusionsproteins aus der Hefezelle	30
2.6.6. Amplifikation der cDNA-Bibliothek der Niere	32
2.6.7. Transformation der cDNA-Bibliothek zum Köderkonstrukt	34
2.6.8. Bestätigung der Interaktion	35
2.6.9. Überprüfung der Autoaktivierung der Interaktionsproteine	35
2.6.10. DNA-Extraktion aus der Hefezelle	36
2.6.11. Herstellung kompetenter KC8-Zellen zur Elektroporation	37
2.6.12. Elektroporation der KC8-Bakterien für die Aufnahme der Hefe-DNA	37
2.6.13. Retransformation der cDNA der Interaktionsproteine	38
2.7. Technik des GST-Pull-Down-Experiments	38
2.7.1. Konstruktion der GST-ROMK-cDNA	40
2.7.2. Aufreinigung des GST-ROMK-Fusionsproteins	41
2.7.3. Proteinextraktion aus der Hefezelle	42
2.7.4. Durchführung der GST-ROMK-Pulldown-Experimente	43
2.8. Immunfluoreszenz	44
2.9. COS-Zellen	44
2.9.1. Transfektion der cDNA in COS-7-Zellen	45
2.9.2. Fixieren der Zellen und Inkubation mit Antikörpern	46

<b><u>3.0. Ergebnisse</u></b>	<b>47</b>
3.1. Allgemeine Übersicht über die möglichen Interaktionspartner aus dem „Yeast-Two-Hybrid“-Screen	47
3.1.1. Einteilung der möglichen Interaktionspartner in Gruppen	54
3.1.2. Festlegung auf Proteine, die für eine Protein-Protein-Interaktion in Frage kommen	54
3.1.3. Einschränkung der Interaktionsproteine nach Autoaktivierungstests und direkten „Yeast-Two-Hybrid“-Versuchen	55
3.2. Allgemeine Charakterisierung der für die weiteren Versuche ausgewählten Proteine	56
3.3. Ergebnisse der ROMK-GST-Pull-Down-Experimente	59
3.4. Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien in COS-7-Zellen	61
<b><u>4.0. Diskussion</u></b>	<b>62</b>
4.1. Drei „Yeast-Two-Hybrid“-Screens- 174 mögliche Interaktionspartner	62
4.1.1. Reduzierung der Proteine auf 13 aussichtsreiche Interaktionspartner	63
4.1.2. Beurteilung der Ergebnisse der „Yeast-Two-Hybrid“-Experimente	64
4.2. Der zytoplasmatische Teil von ROMK bindet an NHERF2, Calponin2, Shank3a, Antiquitin1 und NUMB2 in den GST-ROMK-Pull-Down-Experimenten	66
4.2.1. Beurteilung der Ergebnisse der GST-ROMK-Pulldown-Experimente	66
4.3. Shank3a und ArgBP2 kolokalisieren mit ROMK und verändern sein Muster	68
4.3.1. Beurteilung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien	68
4.4. Diskussion der möglichen Interaktionsproteine- Hypothesen und Gedankenspiele	69
4.5. Ausblick	74
<b><u>5.0 Zusammenfassung</u></b>	<b>75</b>
Abkürzungen	76
Literaturverzeichnis	79
Danksagung	
Lebenslauf	

## **1.0. Einleitung**

### **1.1. Physiologische Rolle von Kalium:**

Kalium spielt als die Hauptkation der Intrazellulärflüssigkeit (nur 2% des Gesamtkörperkaliums befinden sich im extrazellulären Raum) (1, 8) eine wichtige Rolle bei verschiedenen Zellfunktionen. Die hohe Kaliumkonzentration in Zellen (150 mmol/l) und die niedrige Konzentration im Extrazellularraum (4 mmol/l) ist von wesentlicher Bedeutung für die elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen in erregbaren (Nerven, Muskelgewebe) (1, 4) und nicht erregbaren Geweben (Epithel). Für die Einstellung dieses extremen Ungleichgewichtes ist die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe verantwortlich; ein ubiquitär in Plasmamembranen vorkommendes Transportenzym (2, 8, 9). Des Weiteren spielt Kalium bei der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und des Säure-Basen-Haushaltes eine wichtige Rolle (3). Auch beeinflusst es über die Osmolalität der Intrazellulärflüssigkeit die Regulierung des Zellvolumens (4, 5). Die Kaliumaufnahme beträgt durchschnittlich 50-100 mmol/Tag. Die normale Kaliumkonzentration im Blutplasma schwankt zwischen 3,5 und 4,8 mmol/l. Niere und Kolon sind für die Kaliumausscheidung verantwortlich (6, 7).

### **1.2. Die Rolle der Niere für die Kaliumhomöostase**

Im Rahmen des Kaliumhaushaltes kommt der Niere die entscheidende Rolle zu (2). Annähernd 90% der aufgenommenen Kaliummenge werden von der Niere eliminiert, den Rest übernimmt das Kolon. Die Niere ist in der Lage, Kalium bei Belastung netto zu sezernieren oder bei Kaliummangel zu resorbieren. Unabhängig von der Kaliumaufnahme sichert so das präzise Funktionieren der Niere die Homöostase des Gesamtkörperkaliums von 50-55 mmol/kg KG, was schon deshalb vonnöten ist, weil selbst geringe Abweichungen vom normalen Kaliumserumspiegel (3,5-5,0 mM) nach oben, bei Hyperkaliämie, oder nach unten, bei Hypokaliämie, den Organismus erheblich gefährden (3).

### **1.3. Kaliumtransport entlang des Nephron**

Studien an Einzeltubuli der Niere haben gezeigt, dass die Kaliumsekretion durch 3 Prozesse gesteuert wird: Glomeruläre Filtration, Reabsorption von Kalium entlang des proximalen Tubulus und der Henle-Schleife, sowie der bidirektionale Transport (Sekretion und Reabsorption) im kortikalen und äußeren medullären Teil des Sammelrohres (4). Die Richtung und Intensität des Kaliumtransports in den verschiedenen Nephronabschnitten hängt von der seitenspezifischen Verteilung von Transportvorgängen in den Membranen der Tubuluszellen ab. Der Transport von Kalium geschieht entweder auf transzellulärem oder auf interzellulärem Weg. Diese transepithelialen Kaliumflüsse sind erst dadurch möglich, dass Nierenepithelzellen aus zwei unterschiedlichen Membrandomänen aufgebaut sind: zum einen aus einer apikalen und zum anderen einer basolateralen. Diese Polarität wird durch Transporter, Pumpen und Kaliumkanäle in den beiden unterschiedlichen Membranen gewährleistet. So wird der steile Konzentrationsgradient für Kalium über der Zellmembran durch die basolateral liegende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe aufrechterhalten. Apikal sind an den transzellulären Kaliumflüssen neben dem  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter auch verschiedene Typen von Kaliumkanälen beteiligt (5, 6).

### **1.4. Kaliumkanäle der Niere und ihre Funktion**

Kaliumkanäle sind transmembranäre Proteine, die kleine, hydrophile Poren bilden, durch die Kalium passiv diffundieren kann (10). Sie haben bei der Nierenzelle verschiedene physiologische Aufgaben. So sind sie an der Regulation des Zellvolumens (8, 11, 12), der Aufrechterhaltung des Membranpotentials (8, 9) und am transepithelialen Transport von Kalium beteiligt (13). Auch sind sie wichtig für das Recycling von Kalium über die apikale Membran zur Aufrechterhaltung des  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Kotransporters (13, 14, 15, 16) und für die Kaliumsekretion im kortikalen Sammelrohr (14). Kaliumkanäle unterscheiden sich in ihren elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften. Bedingt durch diese Eigenschaften, können  $\text{K}^+$ -Kanäle in fünf unterschiedliche Typen klassifiziert werden:

- a) in spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_v$ ), die aufgrund von Änderungen des Membranpotentials ihre Kanalporen öffnen oder schließen.
- b) in durch Calcium aktivierte Kanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}2+}$ ).



- c) in durch Liganden gesteuerte, z.B. Neurotransmitter, Hormone, cGMP, cAMP.
- d) in ATP-sensitive  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ ), die durch die intrazelluläre ATP-Konzentration reguliert werden
- e) in durch Dehnung aktivierte Kanäle ( $K_{Str}$ ).

### **1.5. Der ATP-abhängige einwärts gleichrichtende Kaliumkanal ROMK**

ROMK ist ein Mitglied der großen Familie der nach innen rektifizierenden Kaliumkanäle. Die Gleichrichtung ist schwach ausgeprägt. ROMK ist ATP-sensitiv, liegt apikal in der Zelle und zeichnet sich durch eine hohe Kaliumselektivität und eine sehr hohe Offenwahrscheinlichkeit aus. ROMK kommt in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers vor, so z.B. in der Magenschleimhaut, dem Gehirn und der Niere, wobei er hier wichtige Aufgaben erfüllt (15, 17, 18, 19, 20). Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife liefert er Kaliumionen zur Aufrechterhaltung des  $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporters und ist damit an der  $Na^+Cl^-$ -Resorption in diesem Abschnitt des Nephron beteiligt (9, 13, 21). Außerdem sorgt ROMK durch die Kaliumsekretion für ein lumen-positives, transepitheliales Potential, das die Triebkraft für den parazellulären Transport von Kationen, wie Calcium und Magnesium in das Interstitium ist. Eine Blockade des Kanals führt zu einer Verminderung des lumen-positiven Potentials und damit auch zu einem Verlust der passiven parazellulären Resorption von Kationen (13). Im kortikalen Teil des Sammelrohres ist ROMK hauptsächlich für die Kaliumsekretion durch die apikale Membran der Hauptzellen zuständig (9, 15).

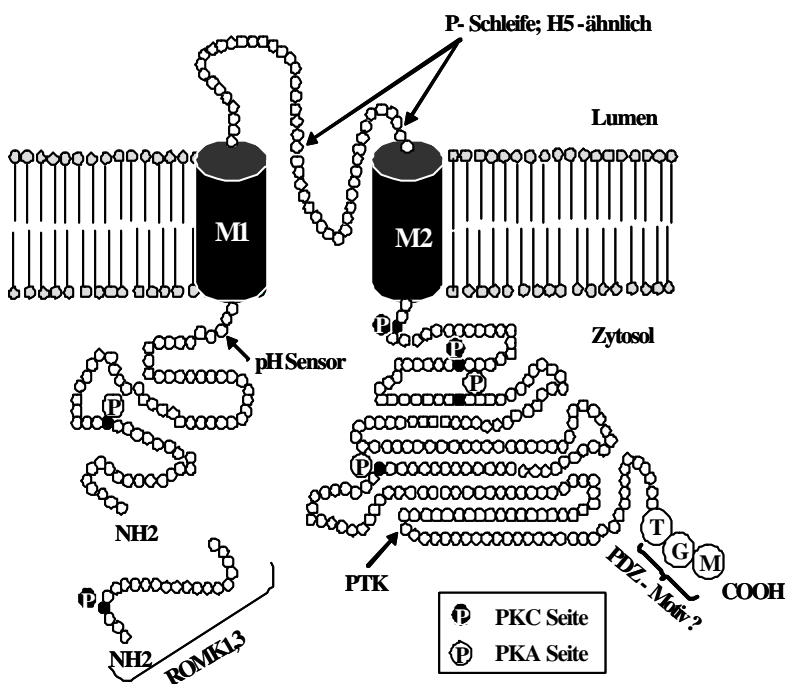
#### **1.5.1. Kanalisformen und ihre Lokalisation**

Verschiedene Isoformen von ROMK wurden identifiziert: ROMK1 (Kir1.1a), ROMK2 (Kir1.1b), ROMK3 (Kir1.1c) und ROMK6 (Kir1.1d). Diese Kanalisformen unterscheiden sich durch Länge und Eigenschaften ihres N-terminalen Endes (23, 24). So hat ROMK2 den kürzesten N-Terminus. 19 bzw. 26 zusätzliche Aminosäuren bilden die Isoformen ROMK1 bzw. ROMK3. Das C-terminale Ende hat bei allen Isoformen die gleiche Aminosäuresequenz (25). ROMK1-3 sind an unterschiedlichen Abschnitten des Nephrons lokalisiert, die sich von dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife bis

zum kortikalen Sammelrohr erstrecken (23, 26). So werden ROMK2 und ROMK3 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Verbindungsstück exprimiert. Außerdem sind ROMK2 und ROMK1 in der apikalen Membran der Hauptzellen des kortikalen Sammelrohres lokalisiert. Des Weiteren ist ROMK1 das einzige Kanalisomer, das im äußeren kortikalen Sammelrohr gefunden wird.

### 1.5.2. Struktur von ROMK

Wie Abbildung 1. zeigt, besteht ROMK aus 2 Transmembran-Domänen, M1 und M2, die durch eine pore-formende Region verbunden sind. Diese pore-formende Region zeichnet sich durch eine große Ähnlichkeit mit der pore-formenden Region, H5, des spannungsabhängigen Kanals (Shaker  $K^+$ - Kanal) aus. Das C- und das N-terminale Ende erstrecken sich ins Zytosol.

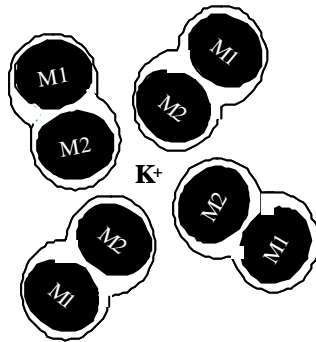


*Abbildung 1. Struktur des ATP-abhängigen Kaliumkanals ROMK. M1 und M2 repräsentieren die beiden Transmembran-Domänen, die charakteristisch sind für die Familie der nach einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle. Ein kurzes Segment zwischen M1 und M2 zeigt Ähnlichkeit mit der pore-formenden Region (P-Schleife oder H5-ähnlich)*

*des Kaliumkanals vom Shaker-Typ. Einige funktionell wichtige Regulationsdomänen sind angegeben. Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Protein-Tyrosinkinase (PTK), Threonin (T), Glutamin (G), Methionin (M).*

Dort dienen sie als wichtige Regulationsdomänen; unter anderem interagieren sie mit Protonen, Nukleotiden, Kinasen, wie z.B. PKA, PKC und PTK, sowie Phosphoinosi-

den (15, 17, 18, 19, 22, 23). Viele Studien deuten darauf hin, dass ROMK, analog dem spannungsabhängigen Kaliumkanal, eine tetramere Struktur formt (s. Abbildung 2.) (27, 28, 29, 30, 31, 32). Von großer Wichtigkeit könnten auch die letzten drei Aminosäuren des C-terminalen Endes von ROMK sein. Die Reihenfolge der Aminosäuren Threonin, Glutamin und Methionin stellt womöglich ein PDZ-Motiv dar, und ist damit an möglichen Protein-Protein-Interaktionen (s. 1.6.2) beteiligt.



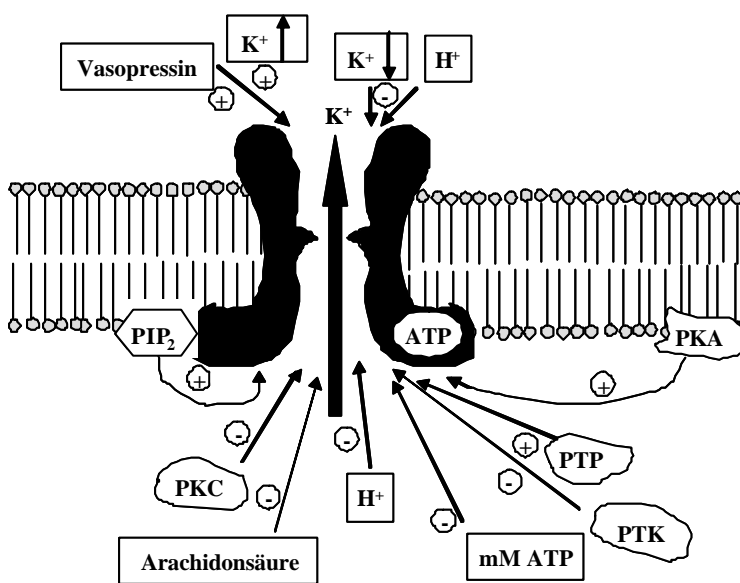
*Abbildung 2. Tetramere Struktur von ROMK-Kanälen.*

### 1.5.3. Regulation von ROMK

Der ATP-abhängige Kaliumkanal ROMK wird durch Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC)-abhängige Phosphorylierungsprozesse reguliert. PKA-induzierte Phosphorylierung ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Kanalaktivität. Alle ROMK-Isoformen haben 3 Serin Phosphorylierungsstellen für PKA, eine an Serin 25 des N-terminalen Endes und zwei am carboxyterminalen Ende, Serin 200 und 294 (ROMK2) (11, 15, 17, 19, 35). Mutationen von einer oder zwei Serinresiduen zu Alanin führen zu nicht funktionierenden Kanälen bzw. reduzieren die Offenwahrscheinlichkeit erheblich (36, 37). Ein Kinase-Anchoring-Protein (AKAP79) ist wichtig für die Funktion von PKA. Experimente, in denen AKAP79 nicht genügend exprimiert wurde, haben gezeigt, dass die Funktion von ROMK beeinträchtigt ist (38). PKC-abhängige Phosphorylierung inhibiert die Aktivität von ROMK; dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von Calcium noch verstärkt. Während ROMK1 drei PKC-Stellen aufweist, haben ROMK2 und 3 nur zwei. Auch hier ist eine Stelle am N-terminalen Ende, die beiden anderen sind am C-terminalen Ende lokalisiert (17, 23, 24, 33, 34). Der sekretorische, apikale Kaliumkanal ROMK wird durch  $Mg^{2+}$ -ATP in seiner Tätigkeit beeinflusst.

Während Konzentrationen im nanomolaren Bereich aktivierend auf ROMK wirken, sind Konzentrationen im submillimolaren Bereich inhibierend (35, 39). Phospholipide wie PIP<sub>2</sub> (Phosphoinositol-4,5-bisphosphat) verändern die Aktivität der ROMK-Kanäle. Die Anwesenheit von PIP<sub>2</sub> reduziert die Empfindlichkeit von ROMK auf den inhibitorischen Effekt von Mg<sup>2+</sup>-ATP. Daher erhöht ein Konzentrationsanstieg von PIP<sub>2</sub> die Kanalaktivität (15, 34). ATP-abhängige Kaliumkanäle sind sehr empfindlich für Veränderungen des Zell-pHs. Ein Abfall des Zell-pHs von 7,4 auf 7,0 hebt die Kanalaktivität vollkommen auf (15). Abbildung 3. gibt eine Übersicht über die Regulation des Kanals.

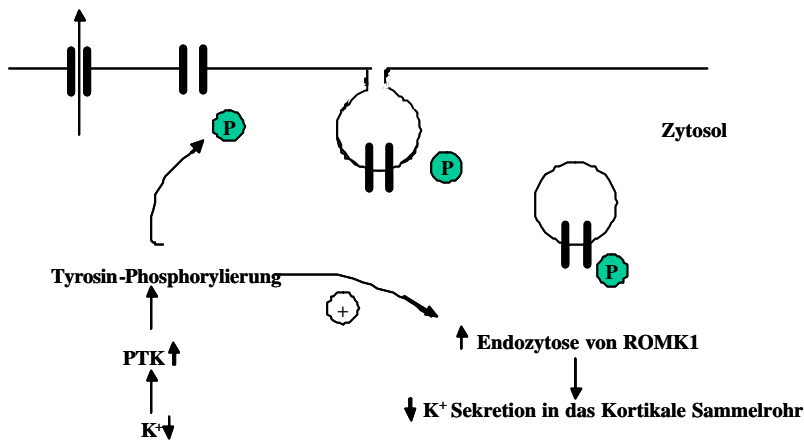
**Abbildung 3. Regulation des ATP-abhängigen Kaliumkanal ROMK.** Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), Proteinkinase A (PKA), Phospho-Tyrosinphosphatase (PTP), Vasopressin und eine hohe extrazelluläre Konzentration an Kalium stimulieren die K<sup>+</sup>-Sekretion durch



ROMK. Dagegen reduzieren Proteinkinase C (PKC), Arachidonsäure, submillimolare Konzentrationen an Adenosintri-phosphat (ATP), Protein-Tyrosinkinase (PTK), H<sup>+</sup>, ein niedriger pH-Wert extra- sowie intrazellulär und eine niedrige extrazelluläre Konzentration an Kalium die Aktivität des Kanals und damit die Sekretion.

Ebenfalls inhibierend auf die Kanalaktivität wirken die Anwesenheit von Arachidonsäure (54) und Einflüsse von Protein-Tyrosinkinasen, PTK. So konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Herbimycin A, einem Inhibitor von PTK, die Anzahl der aktiven Kanäle anstieg (46, 47, 54). Während PTK einen hemmenden Effekt ausüben, stimuliert die Anwesenheit von Protein-Tyrosinphosphatase, PTP die Kanalaktivität (47). Das Zusammenspiel von PTK und PTP beinhaltet Endo- und Exozytoseprozesse, (s. Abbildung 4.), sowie mögliche direkte Phosphorylierungsschritte von ROMK und damit Aktivitätsänderungen (46, 47).

**Abbildung 4. Endozytose-Model von ROMK1 Kanälen.** Eine niedrige  $K^+$ -Konzentration stimuliert Tyrosin-Phosphorylierungsprozesse an ROMK1. Dadurch reduziert sich die Anzahl an Kanälen durch Endozytosevorgänge. Im Gegensatz dazu führen Tyrosin-Dephosphorylierungsvorgänge durch hohe Konzentrationen an Kalium zu verstärkten Einbau von Kanälen in die Membran.



Ein Forschungsschwerpunkt liegt zurzeit auf der Identifizierung von PTK und assoziierten Proteinen und deren Einfluss auf die Kanalaktivität von ROMK. Einfluss auf die Tätigkeit von ROMK im kortikalen Sammelrohr haben Vasopressin und die Konzentration von intrazellulärem Kalium. Sie bewirken eine Änderung in der ROMK-mRNA Expression und wirken daher auf die Kaliumsekretion stimulierend (Vasopressin und eine hohe Kaliumdiät) oder reduzierend (niedrige Kaliumdiät). Es wurde beobachtet, dass Aldosteron keinen akuten Einfluss auf ROMK hat (15, 22).

#### 1.5.4. Interaktion mit anderen Proteinen

Auf die Wichtigkeit des A-Kinase-Anchoring-Protein, AKAP, für die Funktion der PKA-abhängigen Phosphorylierung wurde im Punkt 1.5.3. schon kurz eingegangen. Ein weiteres Protein, das die Aktivität von ROMK modifiziert, ist der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR (41, 44). Bei Studien mit Glibenclamid, einem Kaliumkanalblocker, wurde gezeigt, dass die Kanalinhibition durch Glibenclamid von der Anwesenheit von CFTR abhängig ist (41, 42, 44, 45). Die physiologische Rolle von CFTR bei der Interaktion mit ROMK ist noch nicht genau verstanden, könnte aber bei der Modulation des inhibitorischen Effekts von ATP auf ROMK eine wichtige Rolle spielen (41). Auch stellt sich die Frage, welchen Einfluss Proteine des Zytoske-

letts an der Regulation, dem Einbau in die Membran und der Zielsteuerung von ROMK haben. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Frage, wie es möglich ist, dass ROMK mit einer Offenwahrscheinlichkeit von ca. 95% nach Stimulierung durch z.B. Vasopressin oder Aldosteron weitere Ionen æzernieren kann. Hierfür gibt es zwei Hypothesen:

- a) Es werden ruhende Kanäle, die schon in der Membran sind, durch Stimulierung aktiviert.
- b) In subapikalen Vesikeln gespeicherte Kanäle werden nach Stimulierung in die Membran inseriert.

Studien mit Cytochalasin B oder D, Stoffen, die den Zusammenhalt der Aktinfilamente unterbrechen und die Organisation des Zytoskelett stören, zeigten, dass der Kanal fast vollständig inaktiviert wurde. Daher ist stark anzunehmen, dass Proteine des Zytoskeletts regulierende Tätigkeiten ausüben (43). Des Weiteren haben neue Studien gezeigt, dass die Kanalaktivität durch PTK- und PTP-abhängige Endo- und Exozytose reguliert wird, (s. Abbildung 4.). Hier interessiert, inwiefern PTK-assozierte Proteine in den Regulationsmechanismus von ROMK eingreifen (46, 54), (siehe Kapitel 1.6.2.). Bis heute weiß man auch noch wenig über den Effekt von Zytoskelettproteinen und Proteinkinasen assoziierte Proteinen auf ROMK (42, 43). Daher war es auch meine Aufgabe nach Interaktionspartnern von ROMK zu suchen, (s. 1.6.1).

## **1.6. Protein-Protein-Interaktionen**

Sequenz-spezifische Interaktionen zwischen Proteinen sind die Basis für die strukturelle und funktionelle Organisation einer Zelle. Diese Interaktionen können extrazellulär und intrazellulär stattfinden. Extrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen sind essentiell für die Interaktion zwischen Protein-Ligand und Rezeptor, die Zell-Adhäsion oder auch die Antigenerkennung. Von großer Bedeutung sind intrazelluläre Interaktionen bei der Organisation und Formation des Aktinzytoskeletts sowie bei Signal-Transduktionswegen (43, 49, 51). Viele dieser Interaktionen werden durch bestimmte Proteindomänen vermittelt, die spezifische Motive in der Aminosäuresequenz von Interaktionsproteinen erkennen. Beispiele dieser Domänen sind die Scr-Homologe (SH)2 und SH3 und die

Phosphotyrosin-bindende Domäne PTB. Eine neue peptid-bindende Domäne ist die PDZ-Domäne (50, 52).

### 1.6.1. PDZ-Domäne

Der Name PDZ-Domäne (**PSD 95**, **Dlg** und **ZO1**) leitet sich von drei verschiedenen Proteinen ab, bei denen diese Erkennungsdomäne zum ersten Mal identifiziert wurde: Mammalian Postsynaptic Density Protein -> **PSD 95**, Drosophila disc large tumor suppressor -> **Dlg** und Mammalian tight junction protein -> **ZO1**. Diese Domänen wurden in einer Reihe von Proteinen identifiziert, die bei der Organisation des Zytoskeletts und bei Proteinkomplexbildungen nahe der Plasmamembran beteiligt sind. Des Weiteren sind sie in den Prozess der Signaltransduktion involviert. Diese membranassoziierten Proteine interagieren durch ihre PDZ-Domäne mit dem carboxyterminalen Ende von Zielproteinen, die häufig membranintegriert sind, wie Kanäle, Transporter oder Pumpen (49, 50, 51, 52).

PDZ-Domänen sind globuläre Domänen, die zwischen 80 und 100 Aminosäuren lang sind, wobei häufiges Auftreten der Aminosäuren-Folge GLGF (Glycin-Leucin-Glycin-Phenylalanin) oder DHR (Aspartat-Histidin-Arginin) charakteristisch ist. Abweichungen von dieser Mustersequenz sind aber möglich. Die PDZ-Domäne ist häufig aus 3  $\alpha$ -Helices und 5  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebaut. Ein Protein kann durchaus mehrere PDZ-Domänen für Proteininteraktionen enthalten (50, 51). Die Erkennung eines Interaktionspartners durch ein PDZ-tragendes Protein beruht auf einem spezifischen Erkennungsmotiv des Zielpartners. So wird das Tripeptid-Motiv Serin/Threonin-X-Valin, (X steht für jede beliebige Aminosäure), am carboxyterminalen Ende von Zielproteinen mit hoher Spezifität erkannt (49). Es stellt ein PDZ-Motiv von höchster Spezifität dar, wobei aber auch die Aminosäure an Position 0, hier das Valin (V), durch jede andere hydrophobe, nonpolare Aminosäure ersetzbar ist (bei ROMK Methionin). Auch können PDZ-Motive innerhalb des C-Terminus liegen. Diese würden dann aber mit einer geringeren Spezifität gebunden (52). Eine sehr interessante Entdeckung war die Interaktion eines PDZ-domänentragenden Proteins, PSD95, das zur Familie der membranassoziierten Guanylat-Kinasen gehört, mit dem C-terminalen Ende des Kaliumkanals

vom Shaker Typ. Durch diese Interaktion werden dessen Einbau und Steuerung beeinflusst (53).

Wie oben bereits erwähnt, scheint ROMK an seinem C-terminalen Ende auch ein PDZ-Motiv für die Interaktion mit anderen Proteinen zu haben. Hier stellt sich nun die Frage, inwieweit Proteine, z.B. des Zytoskeletts oder Proteinkinase-assoziierte Proteine (s. 1.5.3 und 1.5.4) mit ROMK interagieren und ebenfalls regulatorisch auf ihn einwirken. Ein PDZ-ähnliches Motiv am C-terminalen Ende von ROMK lässt dies hoffen (Threonin-Glutamin-Methionin). Um mögliche Interaktionspartner mit ROMK zu finden, wurde mit der von Song und Field entwickelnden „Yeast-Two-Hybrid-Technik“ (48, 80) auf Proteinsuche gegangen.

### **1.7. Aufgabenstellung**

Die biophysikalischen und elektrophysiologischen Eigenschaften des ATP-abhängigen Kaliumkanals ROMK sind weitestgehend erforscht und charakterisiert. Noch Fragen werfen die Regulationssteuerung und der Mechanismus des Einbaus der Kanäle in die Plasmamembran nach Stimulierung bzw. Inhibition auf (43, 83). In Punkt 1.5.5 wurde auf zwei mögliche Theorien der Regulationssteuerung von ROMK in der Membran und der möglichen Interaktion mit anderen Proteinen eingegangen (83). Interessant ist nun zu wissen, inwiefern solche Proteine existieren, an welchen Stellen sie an ROMK binden, und welchen Einfluss sie auf ihn ausüben. Um mögliche Antworten auf diese Fragen zu finden, habe ich in meiner Doktorarbeit nach Interaktionspartnern des Kaliumkanals ROMK der Niere gesucht. Daher lautet das Thema dieser Doktorarbeit: **„Suche nach Interaktionspartnern mit dem ATP-abhängigen Kaliumkanal der Niere, ROMK, durch „Yeast-Two-Hybrid“-Screening“**



## **2.0. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Chemikalien**

(Car)-Ampicillin	Sigma C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
1M Phosphorsäure	J.T. Baker H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>
Acrylamid	American Bioanalytical
Agar	Difco
Agarose	American Analytical
Albumin Standard Pierce	Pierce 2mg/ml in 0,9%
Alkohol	Pharmca Ethyl Alkohol
Ammoniumchlorid	J.T. Baker NH <sub>4</sub> Cl
Aprotinin	Sigma
Aquamount	Lerner Laboratories
Benzamidine	Sigma C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> xHCl
Bovine Serum Albumin	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
ComassieBlue	Biorad
Cycloheximide	Sigma (3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)- 2hydroxyethyl]-glutarimide C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>
Dextrose	J.T Baker anhydrous powder C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
DMF	Dimethylformamide American Bioanalytical
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO
dNTP-Mix	Desoxynucleoside Triphosphate Set, Boehringer Ingelheim dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol, Sigma
EDTA	Disodium Salt, Dyhrirate, Crystal C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> x2H <sub>2</sub> O, Ethylenediamine-Tetraacetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol-bis (β-Aminoethyl)-Ether N,N,N'Tetraacetic acid C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> , Sigma

Essigsäure	J.T. Baker CH <sub>3</sub> -COOH
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Gibco BRL
Formaldehyde	J.T. Baker
Gluthione Sepharose Beads	Amersham Pharmacia Biotech. AB
Glycerol	J.T Baker
Glycine	American Bioanalytical H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH
Guanidinde-HCl	Intendon Biotechnologies, Inc. New Haven, Kon- dak. CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> -HCl
HCl	J.T. Baker
Hefe-Extract	Difco
Hepes	American Bioanalytical C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
Herring-Testes-Carrier-DNA	Gibco Salmon Sperm DNA
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranoside, BioVec- tra
Isopropanol	J.T. Baker CH <sub>3</sub> -CH-OH-CH <sub>3</sub>
Kaliumacetat	American Bioanalytical
Kaliumhydrogenphosphat	J.T.Baker K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Kaliumdihydrogenphosphat,	J.T.Baker KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Kanamycin	Sigma C <sub>8</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> xH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
KCl	J.T Baker
L-Adenine Hemisulfat salt	Sigma C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> x1/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
L-Arginine HCl	Sigma C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> xHCl
Leupeptin	Roche Diagnostic GmbH
L-Histidine HCL monohydrate	Sigma C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> xHClxH <sub>2</sub> O
L-Isoleucine	Sigma C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>
Lithiumacetat	Sigma C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Lix2H <sub>2</sub> O
L-Leucine	Sigma C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>
L-Lysine HCl	Sigma C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> xHCl
L-Methionine	Sigma C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S
L-Phenylalanine	Sigma C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
L-Threonine	Sigma C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>

L-Tryptophan	Sigma C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
L-Tyrosine	Sigma C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
L-Valine	Sigma C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
Magnesiumsulfat	Sigma MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O
Mercaptoethanol	America Bioanalytical C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS
Methanol	J.T. Baker CH <sub>3</sub> COOH
MgCl	J.T.Baker
Milchpulver	Non fat Dry Milk Nestle
NaCl	J.T Baker
NaOH	J.T. Baker NaOH
Natriumhydrogenphosphat	J. T. Baker Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O
Natriumdihydrogenphosphat	J. T. Baker NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
PEG	Sigma Polyethylen Glycol
Pepstatin A	Sigma C <sub>34</sub> H <sub>63</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>
PMSF	Gibco BRL Phenylmethylsulfonylfluoride
RnaseA	Boehringer Ingelheim 100mg
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
SDS	American Bioanalytical C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S
Sucrose	J.T Baker analysed C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
TEMED	American Bioanalytical
Thiamine HCL	Gibco BRL
TRIS	American Bioanalytical Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRIS base	American Bioanalytical C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
Tris-HCl	American Bioanalytical C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> xHCl
Triton100x	Acros Organs C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub>
Trypsin	J.T. Baker
Trptone Peptone	Difco
Tween20	America Bioanalytical Polyoxyethelene Sorbitone
Urea	J.T Baker NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>

### 2.1.2. Geräte

Autoklaven, Stiefenhofer

Blotgerät, Hofer

Brutschrank, Heraeus

Digitales pH/Millivolt-Meter 611, Orion Research

Elektroporator (Micropulser), Bio Rad

Eppendorf, Tisch-Zentrifuge

Erlenmeyerkolben, 250, 500, 1000 ,2000ml, Pyrex

Flaschen, 100 ,250, 500, 1000ml, Pyrex

Gelkammern, Hoefer/Stratagene

Inkubatoren für Eppendorf Reaktionsgefäße, Liebisch

Messzylinder, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000ml, Nalgene

Messkolben, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000ml, KIMAX

Misch- und Heizblock, VWR-Scientific

Pasteur Pipetten, Eppendorf

Power Supply, Bio Rad, Modell 200/2.0

Präzision Standard Waage, Ohaus

Rotoren, Beckman –GSA bzw. –SS34, Beckman

Quick Shooter (Gele), Model QSP, International Biotechnologies Inc. (New Haven)

Schüttelndes Wasserbad, Scientific, JNc. Precision

Schüttler, Environ Shaker, Lab Line ORBIT

Sonicator, Stratagene

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments: Rotor GSA und SS34

Spannungsgeräte, Biorad

Spektrometer, Lambda 3B UV/VIS, Perkin Elmer

Sterilbank, Flow Laboratories

Vortexer 2, VWR-Scientific

Waage AJ100, Mettler

Wippe, Reliable Scientific

Zentrifugen, Eppendorf, Beckman

### **2.1.3. Verbrauchsmaterial**

Coverslips, Baxter

Disposable Reagenzgläser, Glass, 130x100mm, MIMAX51, VWR

Entwickler, Kodak

Foto Prep, Fotodyne

Haushaltsfolie

Kimwipe-EX-L, Kimberley Clark

Latexhandschuhe Evolution One, Microflex

3 MM Papier, Whatman

Parafilm (Laboratory Film), Sigma

Pipetenspitze 1-10 $\mu$ l, 1-100 $\mu$ l, 1-200 $\mu$ l, 1-1000 $\mu$ l, USA Scientific

WB Film Hyperfilm, Amersham Pharmaceutical Biotech

Well-Platten, Falcon

## **2.2. Molekularbiologie**

### **2.2.1. Bakterienstämme**

Escherichia coli Stämme:

BL21-Gold (De3) pLysS, Stratagene

KC8-Elektrocompetent Cells, Clontech

Subcloning Efficiency DH5a Competent Cells, Gibco, Life Technologies

### **2.2.2. Hefestämme**

Y 190, Clontech

AH 109, Clontech

### **2.2.3. Zellen und Zellkultur**

COS-Zellen (WT), American Type Culture Collection, USA, zehnte Generation

Alpha-MEM I Reduced Serum Medium without serum, Gibco BRL

Complete Medium, Gibco, BRL

### **2.2.4. Vektoren**

pAS2-1, Clontech

pTD1-1, Clontech

pACT2, Clontech

pGEX4T3, Amersham Pharmacia Biotech

### 2.2.5. Enzyme und Puffer

#### Restriktionsenzyme und Puffer

BamHI, New England Biolabs

EcoRI, New England Biolabs

NEB-Puffer 1, 2, 3, 4 New England Biolabs

BSA-Puffer, 100x Purified New England Biolabs

#### PCR Enzyme und Puffer

Pfu-Polymerase, Boehringer

Taq-Polymerase, Boehringer

10x PCR-Puffer, Boehringer

#### Ligationsenzyme und Puffer

T4 Ligase, New England Biolabs

T4 Ligase Puffer, New England Biolabs

### 2.2.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der HHMI/Keck Oligonucleotide Synthesis Facility der Yale University bezogen.

#### Sequenzier-Primer:

ROMK-BD Fusionsprotein: 5`GGGGCTACCGTTTCGTTTCCTATTGTGTCC  
3`GGACACAATAGGAACGAAACGGTAGCCCC

ROMK-GST Fusionsprotein: 5`GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG  
3`CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG

Gal4BD-Primer: 3`CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC

Gal4AD-Primer: 3`CCAGGCAGGTTGGTCCA

#### PCR-Primer:

Konstruktion des Köders ROMK-BD (pAS2-1):

5`GGAATTCACGTTTCAGCAAGAAT

3`CGGGATCCGCTACATCTGGGTG

Konstruktion des Köders GST-ROMK (pGEX4T3), (aus pAS2-1 ROMK-BD Produkt):

5`CGGGATCCACGTTTCAGCAAGAATGCG

3`CGAATTCTCGACGGATCCCTACATCTG

### 2.2.7. Größenmarker

DNA-Größenmarker:	1 kb DNA ladder, Bio Rad
	123 bp DNA ladder, Bio Rad
Protein-Größenmarker:	Molecular Weight Standards High range, Bio Rad Protein Assay, Bio Rad
	Molecular Weight Standards Low range, Bio Rad Protein Assay, Bio Rad

### 2.2.8. Antikörper

Alexa Flour 568 goat anti-Hase IgG (H+L) conjugate,	Molecular Probes
Alexa Flour 488 goat anti-Maus IgG (H+L) conjugate,	Molecular Probes
Anti-Maus IgG (whole molecule) peroxidase conjugate,	Sigma
Anti-Ziege IgG (whole molecule) peroxidase conjugate,	Sigma
Anti-ROMK, polyklonaler Kaninchenantikörper,	Alomone Labs
Anti-HA11, monoklonaler Mausantikörper,	Berkerly Antibody Company
Anti-c-MYC 9E10, monoklonaler Mausantikörper,	Sigma
Gal4BD Monoklonaler Mausantikörper	Clontech

### 2.2.9. Kit-Systeme

LipofectAMINE 2000 Reagent, Gibco BRL, Life Technologies  
PerFect Lipids, Invitrogen  
QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Prep Kit, Qiagen  
QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen  
QIAquick PCR Purifikation Kit, Qiagen  
QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen

### **2.3. Verwendete Lösungen und Substanzen**

- alle verwendeten Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, in aqua dest. angesetzt. Die Angabe % bei der Zusammensetzung bedeutet g/100ml.

#### **2.3.1. DNA-Präparation, Ligation, Klonierung**

##### **PCR-Reaktionsansatz, Konstruktion der Köder-cDNA: ROMK-BD und GST-ROMK**

5 µl	10x PCR-Puffer
5 µl	dNTP (2 mM)
0,5 µl	Primer I (50 µmol)
0,5 µl	Primer II (50 µmol)
0,25 µl	Taq Polymerase (5 Einheiten/µl)

**5x DNA Probenpuffer:** Glycerol (80%), Bromophenol Blau (0,025%), Xylene Cyanol (0,025%), 100 mM EDTA

**Agarosegel (1,2%):** 50 ml TAE, 0,6 g Agarose, 2 µl Ethidiumbromid

**50x TAE:** 242 g Tris Base, 57,1 g Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

#### **2.3.2. „Yeast-Two-Hybrid“-Screen**

##### **2.3.2.1 Hefezellen-Versuchslösungen und Nährmedien**

###### **Stammlösungen:**

**10x LiAc-Lösung:** 1 M Lithium Acetate (Sigma #L-6883) Angleichen des pH auf 7.5, autoklaviert.

**10x TE Puffer:** 0,1 M Tris HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5, autoklaviert.

**DMSO (100%):** (Dimethyl sulfoxide; Sigma #D-8779)

**PEG 3350 (50%):** (Polyethylene Glycol , avg. mol. Wt. =3,350; Sigma #P-3640) mit sterilem Wasser zubereitet.

**PMSF: (phenylmethl-sulfonyl fluoride) 100x:**

0,1742 g PMSF (Sigma #P7626) in 10 ml Isopropanol gelöst.

**Thiamine-HCl:** (1 M, filtersterilisiert)

**Glas Perlen:** (425-600 µm Sigma #G-8772)



### **Herring-testes-carrier-DNA (10 mg/ml)**

DNA wurde vor Gebrauch für 20 Minuten im Wasserbad gekocht

### **X-gal Stammlösung**

5-brom-4-chloro-3 indolyl- $\beta$ -galactopyranoside (X-GAL; #8060-1) in N,N-dimethylformamide (DMF) bei einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst.

### **10x Dropout (DO)Lösung**

beinhaltet alle, oder je nach Bedarf, das Weglassen einer oder mehrerer Aminosäuren.

L-Isoleucin	300 mg/L
L-Valin	1500 mg/L
L-Adenin hemisulfate salt	200 mg/L
L-Arginin HCl	200 mg/L
L-Histidin HCl monohydrate	200 mg/L
L-Leucin	1000 mg/L
L-Lysin HCl	300 mg/L
L-Methionin	200 mg/L
L-Phenylalanin	500 mg/L
L-Threonin	2000 mg/L
L-Tryptophan	200 mg/L

**Note:** Serin, Aspartat und Glutamat wurden nicht hinzugefügt, da sie den pH des Mediums sauer machen. Hefezellen können diese Aminosäuren (AS) endogen synthetisieren.

### **YPD-Medium (pH 5,8, autoklaviert)**

20 g/L	Tryptone Peptone
10 g/L	Hefe Extrakt
20 g/L	Agar (nur für Platten)
950 ml	ddH <sub>2</sub> O
nach Abkühlen auf 55° hinzugefügt:	
50 ml	Dextrose (40%) (steril)
0,2%	Adenin Hemisulfat (AH109)

### **SD-Medium (pH 5,8, autoklaviert)**

6,7 g	Hefe Nitrogen-base ohne AS
100 ml	von der gewünschten 10x DO- Lösung
20 g/L	Agar (nur für Platten)
850 ml	ddH <sub>2</sub> O
nach Abkühlen auf 55° C hinzugefügt:	
50 ml	Dextrose (40%) (steril)
0,2%	Adenin Hemisulfat (AH109)

bei Bedarf als Zusatz ab <55°C hinzugefügt:

5-35 mmol	3 AT	1 M	Thiamine-HCl
1 mg/ml	Cycloheximide	20 mg/ml in DHF	X-gal

**SOC-Medium (pH 7, autoklaviert)**

20 g/L	Bactotryptone
5 g/L	Hefe Extrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	Glukose (steril)
ca. 1 L	ddH <sub>2</sub> O

**Cracking-Puffer Stammlösung**

8 M	Urea
5%	SDS
40 mM	Tris HCl (pH 6,8)
0,1 mM	EDTA
0,4 mg/ml	Bromophenol Blau
ca. 100 ml	ddH <sub>2</sub> O

**Cracking-Puffer (1,13 ml)**

1 ml	Stammlösung
10 µl	Mercaptoethanol
70 µl	Protease-Inhibitoren (gekühlt)
50 µl	PMSF (100x)

**Protease-Inhibitor-Cocktail**

0,1 mg/ml	Pepstatin A
0,03 mM	Leupeptin
145 mM	Benzamidin
0,37 mg/ml	Aprotinin

**STET**

8 g	Sucrose
50 mM	Tris pH 8
50 mM	EDTA
5%	Triton X-100

**PEG/LiAc Lösung**

40%	PEG 4000 (steril)
1x	TE Puffer (steril)
1x	LiAc (steril)

**Z-Buffer (pH7, autoklaviert)**

16,1 g/L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
5,50 g/L	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
0,75 g/L	KCl
0,246 g/L	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

**Z-Puffer/X-gal- Lösung**

100 ml	Z-Puffer
0,27 ml	β-mercaptoethanol
1,67 ml	X-gal-Stammlösung

### 2.3.2.2. Bakterien-Versuchslösungen und Nährmedien

#### LB (Luria-Bertani)-Medium (steril)

10 g/L	Tryptone Peptone
5 g/L	Hefe Extrakt
10 g/L	NaCl
20 g/L	Agar (nur für Platten)
ca. 1 L	ddH <sub>2</sub> O

#### 5x M<sub>9</sub>-Minimallösung (steril)

64 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
15 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,5 g	NaCl
5 g	NH <sub>4</sub> Cl

#### M<sub>9</sub>-Medium (steril)

100 ml	SD-L
688 ml	ddH <sub>2</sub> O
20 g/L	Agar (nur für Platten)
nach Abkühlen auf 55°C hinzugefügt:	
200 ml	5x M <sub>9</sub> -solution (steril)
10 ml	Dextrose (40%) (steril)
1 ml	Thiamin-HCl (steril)
1 ml	Ampicillin (steril)

#### LB/Glycerol (steril)

75%	LB-Medium
25%	Glycerol

### 2.3.3. GST-ROMK-Pulldown-Experimente

#### a) Stammlösungen:

**Ampicillin:** 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O gelöst.

**IPTG:** 100 mM, 1 g IPTG in 42 ml sterilem H<sub>2</sub>O gelöst.

**Puffer A:** 36,3 g TRIS base (3M), 48 ml 1 N HCl, ddH<sub>2</sub>O zu 100 ml aufgefüllt, pH 8,9.

**Puffer B:** 5,7 g TRIS base (0,47M), 25,6 ml 1M Phosphorsäure, zu 100 ml aufgefüllt, pH ca. 6,7.

**10x Running-Puffer:** 5 mM TRIS base, 150 mM Glycin, SDS (0,02%)

**APS (10%):** 1 mg Ammonium Persulfat in 10 ml ddH<sub>2</sub>O aufgelöst.

**2x Sample Ladepuffer:** 1,0 ml 1M DTT, 3,5 ml SDS (20%), 1,0 ml Bromophenol Blau (0,1%), 2 ml Glycerol, 1,0 ml 3 M TRIS pH 8,9 (Buffer A), 1,5 ml ddH<sub>2</sub>O

**10x TAE (Tris/Acetate/EDTA)/1L:** 242 g TRIS base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

**10x Tris-Glycine/ 1L:** 30 g Tris Base (0,25 M), 144 g Glycine, 20 g SDS, pH 8,3

**Hefe-Resuspension-Puffer**

10 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
0,25 M	Sucrose
420 µl/6 ml	Protease-Inhibitoren
300 µl/6 ml	PMSF

**Perlen-Binde-Puffer**

50 mM	Kaliumphosphat pH 7,5
150 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10%	Glycerol
1%	Triton X-100
n. Bedarf	PMSF
n. Bedarf	Protease-Inhibitoren

**b) Western Blot:**

**Running Gel 12% (5 ml)**

1,6 ml	ddH <sub>2</sub> O
2,0 ml	Acrylamid (30%)
1,25 ml	Puffer A
50 µl	SDS (20%)
2 µl	TEMED
50 µl	APS (10%)

**Stacking Gel 5%**

1,4 ml	ddH <sub>2</sub> O
0,33 ml	Acrylamid (30%)
0,25 ml	Puffer B
20 µl	SDS (20%)
2 µl	TEMED
20 µl	APS (10%)

**TBST (Wasch-Lösung)**

100 ml/L	10x TAE
900 ml/L	ddH <sub>2</sub> O
1 ml/L	Tween 20 (0,1%)

**Blocking-Puffer**

200 ml	TBST
2 g	BSA (1%)
10 g	Milchpulver (5%)

**Transfer-Puffer**

700 ml	dH <sub>2</sub> O
200 ml	Methanol
100 ml	10x Tris-Glycine
1 ml	SDS (20%)

**10x Elektrophorese-Puffer**

30g/L	Tris base
142g/L	Glycin

### 2.3.4. Immunfluoreszenz

#### Stammlösungen:

**4x PBS/1L** (phosphate-buffered saline): (pH 7,4): 35,08 g NaCl, 0,88 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,77 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

#### PBS++ ( 1 L)

10 ml	MgCl <sub>2</sub> (100 mM)
1 ml	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)
989 ml	1x PBS

#### Permealisation-Puffer:

0,3%	Triton-x-100
0,1%	BSA
200 ml	PBS++

#### 0,1 M NaPi (pH 7,4)

77,4 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M)
22,6 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)

#### 2x GSDB (300 ml)

100 ml	Goat Serum (0,24 M)
50 ml	240 mM NaPi (pH 7,4)
54 ml	5 M NaCl
94,2 µl	ddH <sub>2</sub> O
1,8 ml	Triton-X-100

## 2.4. Methoden

### 2.5. Technik der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode

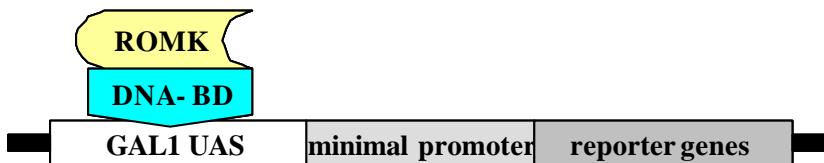
Das „Yeast-Two-Hybrid“-System, entwickelt von Fields und Song 1989, ist eine sehr wirksame Technik um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu testen (81). Die Idee dieser Technik ist die Herstellung zweier Fusionsproteine. Diese setzen sich jeweils aus den beiden auf Interaktion zu testenden Proteinen und zweier unterschiedlichen Domänen eines Transkriptionsfaktors zusammen. Der Transkriptionsfaktor Gal4p aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus zwei funktionell unabhängigen, trennbaren Domänen, einer N-terminalen DNA-Bindedomäne (Gal4-BD) und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (Gal4-AD). Die DNA-Bindungsdomäne ermöglicht die Bindung des Transkriptionsfaktors an sequenzspezifische, regulatorische DNA-Sequenzen (UAS, „upstream activating sequences“) im Promoterbereich der Zielgene, während die Transaktivierungsdomäne für die Initiation der Transkription erforderlich ist. Wenn die Domänen durch rekombinante DNA-Technologie voneinander getrennt werden,

können sie nicht zusammen interagieren und damit auch nicht das Ablesen von Genen ermöglichen.

Wenn sie nun wieder in enge Nachbarschaft zueinander gebracht werden, wird die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung wiedererlangt. Um eine mögliche Wechselwirkung eines bekannten Proteins (Köderprotein oder auch „bait“ genannt) mit bisher unbekannt Proteinen zu identifizieren, wird das bekannte Protein (Fisch) mit der GAL4-BD fusioniert (s. Abbildung 5. I), während die unbekannt Proteine einer Gen-Bibliothek an die GAL4-AD fusioniert sind (s. Abbildung 5. II). Bei der möglichen Interaktion des bekannten Proteins mit Interaktionsproteinen, werden die beiden Domänen wieder in enge Nachbarschaft zueinander gebracht, und es kommt zur transkriptionellen Aktivierung spezifischer Reportergene, (s. Abbildung 5. III).

**Abbildung 5. Model der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode**

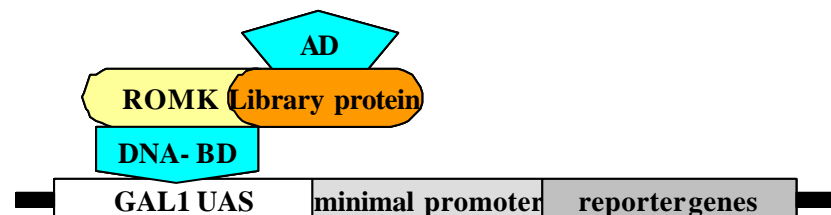
I) Das ROMK-BD (Köder)-Fusionsprotein bindet an die GAL1 UAS (Upstream activation site), kann aber die Transkription der Reporter Gene ohne Anwesenheit der Gal4AD nicht aktivieren.



II) Das Protein X-AD (Fisch)-Fusionsprotein (aus der Gen-Nierenbibliothek) kann in Abwesenheit der BD nicht an die GAL1 binden und damit die Transkription nicht alleine starten.



III) Die Interaktion zwischen Köder und Protein X (Fisch) *in vivo*, bringt BD und AD zu einer funktionellen Einheit wieder zusammen und ermöglicht die Transkription der Reporter Gene.



Diese Reportergene besitzen in ihrer Promoterregion die spezifischen UAS-Sequenzen, so dass im Idealfall die Bindung nur eines Transkriptionskomplexes, bestehend aus dem Köderprotein und dem interagierenden Protein (Protein X), die Transkription dieser Gene ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme Y190 und AH109 brauchen zum Wachstum im untransformiertem Zustand, YPD-(Y190), bzw. YPDA-(AH109) Hefemedium. Sie besitzen zwei Reportergene, *HIS3* und *lacZ*, während der Hefestamm AH109 noch zusätzlich das Reportergen *ADE2* besitzt. *HIS3* kodiert für ein Enzym, welches für die Biosynthese der Aminosäure Histidin essentiell ist, während *ADE2* für ein Enzym kodiert, welches für die Biosynthese der Base Adenin nötig ist. Das *lacZ*-Gen ist ein bakterielles Gen, welches für  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Ein weiterer Unterschied liegt an dem Hintergrundwachstum. Während bei dem Stamm AH109 kein Hintergrundwachstum auf histidinfreien Platten beobachtet werden kann, zeigt der Stamm Y190 ein Restwachstum, da der Minimalpromoter eine geringe Expression des *HIS*-Genes erlaubt. Dieses Hintergrundwachstum wird mit 25-40 mmolarem 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) unterdrückt. Diese Substanz ist ein spezifischer Inhibitor des Enzyms, welches durch *HIS3* kodiert wird. Um eine möglichst große Anzahl an Proteinen auf Interaktion mit ROMK zu testen, wurde eine humane cDNA-Bibliothek aus Nieren der Firma Clontech, Inc. bezogen. Insgesamt beinhaltet diese cDNA-Bibliothek ungefähr 3,5 Millionen unabhängige Klone. Die hohe Anzahl an unterschiedlichen Klonen gewährleistet bei der Transformation dieser cDNA-Bibliothek in Hefezellen eine große Vielfalt an unterschiedlichen Proteinen. Köder- sowie Fisch-Vektor tragen Markergene zur Synthese unterschiedlicher Aminosäuren in Hefezellen. Das ermöglicht die nutrielle Selektion von mit den Vektoren transformierten Hefezellen auf speziellen Agarplatten. Bevor aber der eigentliche Screen, die Transformation beider Plasmide in eine Hefezelle, vollzogen werden kann, muss der Köder auf Autoaktivierung getestet werden. Es ist möglich, dass die Transkription ohne die Anwesenheit der AD-Domäne, durch das Fusionsprotein ROMK-Gal4BD ausgelöst wird. Erst wenn diese Autoaktivierung, die die Durchführung des Versuchs unmöglich macht, ausgeschlossen ist, kann zum eigentlichen Experiment übergegangen werden. Falls eine Interaktion zwischen ROMK und Protein X stattgefunden hat, erlangen die Hefezellen aufgrund dieser Interaktion und der damit verbundenen Aktivierung der Reportergene die Fähigkeit, auf Selektionsplatten zu

wachsen. Klone vom Hefestamm Y190 zeigen dann auch Wachstum auf Platten, denen nicht nur Tryptophan (Trp<sup>-</sup>) und Leucin (Leu<sup>-</sup>) fehlt, sondern auch Histidin (His<sup>-</sup>). Bei dem Hefestamm AH109 wird dann auf Vierfach-Selektionsplatten selektioniert (Trp<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Ade<sup>-</sup> (Adenin)). Falls nun auf diesen Dreifach- bzw. Vierfach-Selektionsplatten nach Transformation der cDNA-Bibliothek Kolonien wachsen sollten, und damit mögliche Interaktionsproteine in Frage kommen, müssen diese Interaktionen bestätigt werden. Alle positiven Klone wurden daher nochmals auf den Selektionsplatten ausgestrichen und die Interaktion überprüft und sichergestellt. Außerdem muss ausgeschlossen werden, dass nicht der „Fisch“ alleine die Fähigkeit besitzt, die Reporter Gene zu aktivieren und damit ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen führt (Autoaktivierung des Fisch-Proteins). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion des Protein X nicht mit dem C-terminalen Ende von ROMK stattfindet, sondern mit der Gal4BD-Domäne. Auch diese unechten, falsch-positiven Ergebnisse sind zu eliminieren (nicht-spezifische Aktivierung).

## **2.6. Ablauf des „Yeast-Two-Hybrid“-Screens**

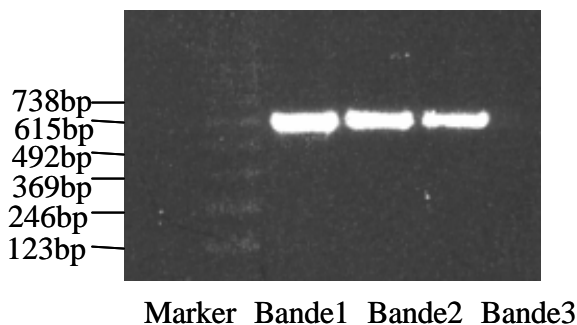
### **2.6.1. Konstruktion der Köder-cDNA**

Protokolle und Angaben zu Medien und Lösungen wurden aus dem User Manual der Firma Clontech entnommen. Die cDNA von ROMK wurde von Gordon MacGregor bezogen, Yale University, Department of Cellular and Molecular Physiology, New Haven, Laboratory of Professor Gerhard Giebisch. Die cDNA stammt von der Ratte „*Rattus norvegicus*“ (ROMK2, Genbank-Accessionnummer: L29403) **Zhou H, Tate SS, Palmer LG**. Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am. J. Physiol.* (1994) Mar;266(3 Pt 1):C809-24. Zur Herstellung des Köderproteins wurde ein 600bp-Fragment mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, welches für den zytoplasmatischen Teil von ROMK kodiert (ROMK-c). Als Primer für die PCR-Reaktion dienten am 5'-Ende die Basensequenz GGAATTCACGTTTCAGCAAGAAT und am 3'-Ende CGGGATCCGCTACATCTGGGTG. Die Primersequenzen beinhalten die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI*, GAATTC am 5'-Ende und GGATCC für *BamHI* am 3'-Ende. Es wurden drei Reaktionsansätze für die PCR



gewählt, wobei nur die Konzentration an Magnesiumchlorid (1,5 mM (Bande1), 3 mM (Bande2) und 4,5 mM (Bande3)) variiert wurde, (s. Abbildung 6.). Die Dauer der Reaktion betrug ca. 2 Stunden. Es wurden ca. 30 Zyklen durchlaufen. Der Reaktionsansatz wurde unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit Protocol aufgereinigt. 10µl des PCR-Reaktionsproduktes wurden mit 2,5 µl 5x TAE/Dye gemischt und

**Abbildung 6. Agarosegel des PCR-Produkts ROMK-BD cDNA**



auf einem Agarosegel (1,2%) laufengelassen, dass sich die mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI erweiterte cDNA von ROMK-BD auf der richtigen Höhe befindet. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein 123bp Marker verwendet. Die Laufzeit betrug ca. 30 Minuten bei 100 V. Wie das Gel in Abbildung 6 zeigt, befindet sich das ROMK-BD cDNA-Konstrukt

auf der richtigen Höhe, bei ca. 600bp. Als nächstes wurde der Köder-Vektor pAS2-1 und das PCR-Produkt geschnitten. Dafür wurde eine 60 µl Reaktion angefertigt, wobei jeweils 2 µl der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI, sowie 0,6 µl BSA-Puffer und 6 µl Puffer 2 pipettiert wurden. Für den Reaktionsansatz von pAS2-1 wurden 29,4 µl sterilen Wassers und 10 µl DNA und für das PCR-Produkt 9,4 µl sterilen H<sub>2</sub>O und 40 µl cDNA verwendet. Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 37° C für 2 Stunden inkubiert und danach mit Hilfe des QIA Quick PCR Purification Kit aufgereinigt. Um den Erfolg des Restriktionsverdau zu überprüfen, wurden beide cDNAs auf einem Agarosegel (1,2%) laufengelassen (100 V für ca. 30-45 Minuten). Für die Ligation wurden drei verschiedene Ansätze vorbereitet, wobei die DNA-Konzentration variierte. Es wurde zusätzlich auch eine Negativ-Kontrolle mit sterilem Wasser durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl, wobei jeweils 0,5 µl Vector-DNA, 1,0 µl Ligase-Puffer und 0,5 µl Ligase verwendet wurden. Die cDNA-Menge des Köders betrug einmal 1,5 µl und für den zweiten Ansatz 0,5 µl. Für die Negativ-Kontrolle wurden 8,0 µl sterilen Wassers und für die beiden anderen Ansätze 6,5 µl bzw. 7,5 µl pipettiert. Die Ligation spielte sich bei 15°C über Nacht ab.

## **2.6.2. Transformation der Köder cDNA in E.coli**

Für die Transformation wurden der E. coli Stamm DH5a verwendet. Die Transformation wurde nach dem Protokoll von **Sambrook et al**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Second Edition, durchgeführt. DH5a wurden aufgetaut und 50 µl mit 1 µl bzw. 3 µl Ligationsprodukt transformiert. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten auf Eis gelassen, dann für 20 Sekunden bei 37°C temperaturschockiert. Danach wurde 1 ml LB-Medium (Luria-Bertani), ein bestimmtes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien, hinzugegeben und für eine Stunde bei 37° C und 250 UpM inkubiert. 10 µl bzw. 100 µl wurden auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

### **2.6.2.1. DNA-Isolierung aus Bakterien**

Nach erfolgreicher Transformation wurden DNA-Minipräparationen durchgeführt. Hierfür wurden das Protokoll und die Materialien von Qiagen Miniprep verwendet. Dabei wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml LB-Ampicillin-Medium über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die isolierte cDNA wurde zum Sequenzieren an die HHMI-Bio-polymer/W.M. Keck Biotechnology Resource Laboratory Yale University DNA Sequencing geschickt. Als Primer diente der Matchmaker 5'Primer von der Firma Clontech. Auch wurden noch 2 weitere Primer konstruiert, die in der Mitte des DNA-Konstrukts ansetzten: SQM 5': GGGGCTACCGTTTCGTTTCCTATTGTGTCC und SQM 3': GGACACAATAGGAACGAAACGGTAGCCCC. Von insgesamt sieben verschiedenen Minipreps zeigten vier die gewünschte DNA-Sequenz. Der nächste Schritt war die Transformation des Hefestammes Y190 bzw. AH 109 mit der konstruierten Köder-DNA.

## **2.6.3. Transformation der Köder-cDNA in die Hefezelle**

Mehrere auf YPD-Medium wachsende untransformierte Hefekolonien wurden in 1 ml YPD-Medium inokuliert und gründlich homogenisiert, um Zellklumpen aufzulösen. Die Zellsuspension wurde dann in ein größeres Volumen von 50 ml YPD-Medium transferiert und bei 30° C für 16-18 Stunden bei 250 UpM im Schüttler inkubiert, bis eine sta-

tionäre Phase von  $>1,5$  optische Dichte bei 600 ( $OD_{600}$ ) erreicht wurde. Ein Teil dieser Übernachtkultur wurde in 300 ml YPD-Medium transferiert, bis die optische Dichte in dem größeren Medium 0,2-0,3 betrug. Diese Kultur wurde bei 30° C bis zu einem  $OD_{600}$  von  $0,5\pm 0,1$  wachsen gelassen. Nachdem die Hefezellen diese optische Dichte nach einer Dauer von ungefähr 3-6 Stunden erreicht hatten, wurden sie in 50 ml Gefäße pipettiert und bei 1000x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 25-50 ml sterilem Wasser resuspendiert und danach bei 1000x g für 5 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml 1x TE/LiAc resuspendiert. Bevor die kompetenten Zellen weiter verwendet wurden, wurde die PEG/LiAc-Lösung frisch zusammengestellt. Zur Durchführung der Transformation, wurden in ein Eppendorfgefäß 0,1 µg ROMK-BD DNA-Konstrukt, 0,1mg Herring-testes-carrier-DNA und 0,1 ml kompetente Hefezellen zusammenpipettiert. Zur Kontrolle des Erfolgs der Transformation und um mögliche Fehler ausschließen zu können, wurden anstelle der Köder-cDNA nur die Vektoren pAS2-1 bzw. pACT2, sowie ein Eppendorfgefäß nur mit der Carrier-DNA präpariert. Die Suspension wurde gründlich durchmischt und dann 0,6 ml von der präparierten PEG/LiAc-Lösung dazugegeben und bei Maximalgeschwindigkeit homogenisiert. Die Zellsuspension wurde bei 30° C für 30 Minuten im Inkubator bei 200 UpM geschüttelt. Dann wurden 70 µl DMSO dazugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 42° C im Wasserbad temperaturgeschockt und dann auf Eis für 1-2 Minuten abgekühlt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur und 14.000 UpM für 5 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Schluss wurde das Pellet in 0,5 ml 1x TE resuspendiert. Alle transformierten Zellen wurden mit 10 µl bzw. 100 µl auf SD-Trp<sup>-</sup>-Platten ausgestrichen und für 2-4 Tage bei 30° C inkubiert. Nur die mit dem Köder und die pAS2-1 transformierten Hefezellen sollten Wachstum auf diesen Selektionsplatten zeigen. Hefezellen, die pACT2 bzw. nur die Carrier-DNA aufnahmen, durften bzw. konnten nicht auf den SD-Trp<sup>-</sup>-Platten wachsen.

#### **2.6.4. Überprüfung der Autoaktivierung des Köderproteins**

Es besteht die Möglichkeit, dass die Reportergene für die Aminosäure Histidin, die Base Adenin und für das Enzym *lacZ* auch ohne Anwesenheit des Fischproteins, und da-

mit ohne eine Interaktion der Testproteine abgelesen werden. Da hierdurch ein Wachstum auf den Selektivplatten und eine Farbreaktion beim  $\beta$ -Galaktosidase-Test stattfinden würden, müssen diese falsch-positiven Hefeklone eliminiert werden (s. 2.5). Um auf diese Weise falsch-positive Klone ausschließen zu können, wurde die ROMK-BD-DNA mit dem Fischvektor pACT2 transformiert (Autoaktivierung des Köderproteins). Um eine nicht-spezifische Aktivierung mit einem unspezifischen Protein, das an ROMK nicht binden kann, auszuschließen, wurde die ROMK-BD-DNA mit pTD1-1 transformiert. Es wurde das gleiche Protokoll verwendet, wie oben angegeben. 100  $\mu$ l Transformantensuspension wurden auf SD-Trp<sup>-</sup>-Leu<sup>-</sup>-Platten ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Desweiteren wurde mit dem mit ROMK-BD (dem Köder alleine) transformierten Hefestamm auch ein *lac-Z*-Test durchgeführt. Auch wurden die Kotransformanten ROMK-BD/ pACT2 und ROMK-BD/pTD-1 mit dem gleichen Test auf Autoaktivierung überprüft. Näheres zu dieser Methodik siehe 2.6.8.

### **2.6.5. Extraktion des ROMK-Gal4BD-Fusionsproteins aus der Hefezelle**

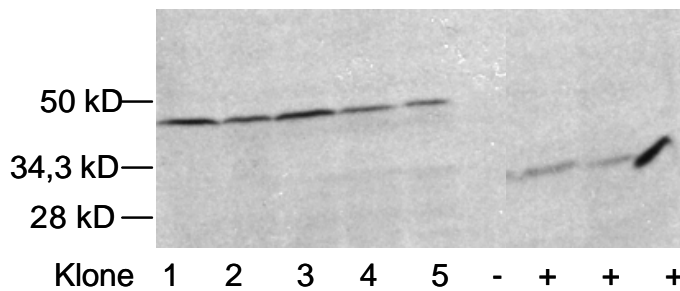
Eine Bestätigung der erfolgreichen Transformation ist die Extraktion des Köder-Proteins aus der Hefezelle. Dabei wird überprüft, ob die Hefezelle den gewünschten Köder exprimiert. Um dieses Experiment nicht mehrfach durchführen zu müssen, wurden mehrere Hefekolonien auf Expression des Köderproteins überprüft. Um den Erfolg des Western Blots und die Funktion des Antikörpers gegen die Gal4BD zu überprüfen, wurde der Versuch zusätzlich auch mit einer negativen und drei positiven Kontrollen durchgeführt (s. Abbildung 7.). Jede Hefekolonie wurde in einem Gefäß mit 5 ml SD-Trp<sup>-</sup>-Medium über Nacht inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde auch eine untransformierte Hefezelle in YPD-Medium über Nacht inkubiert. Die Nachtkulturen wurden jeweils in ein größeres Volumen von 50 ml SD-Trp<sup>-</sup> bzw. YPD-Medium transferiert, bis auch hier der Anfangs OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,3 lag. Die Kolonien wurden bis zu einer Dichte von 0,4-0,6 für 4-7 Stunden wachsen gelassen. Um die Menge an Cracking-Puffer (bricht die starren Zellwände der Hefezellen auf) festzulegen, wurden das Zellvolumen und die optische Dichte miteinander multipliziert; (Rechnungsmodus entnommen aus Yeast Protocols Handbook, Clontech Laboratories, Inc.). Wenn man dieses Ergebnis durch 7,5 dividiert und wieder mit 100 multipliziert, erhält man das Volumen an Cra-

cking-Puffer in Millilitern, in dem das Hefezellpellet resuspendiert wurde. So ergaben sich beispielsweise für ein Zellvolumen von 55ml und einen OD<sub>600</sub> von 0,6, 33 Total OD<sub>600</sub>. Dieses Ergebnis wurde durch 7,5 dividiert und mit 100 multipliziert. Das Hefezellenpellet wurde daher in 440 ml Cracking-Puffer resuspendiert. Nach dem Ernten der Hefezellen, wurden diese in mit Eis halbvoll gefüllte Zentrifugiergefäße für 5 Minuten bei 4° C und 1000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Wieder wurde unter den gleichen Umständen zentrifugiert und das Pellet sofort bei - 80° C eingefroren. Das Pellet wurde auf Eis langsam aufgetaut und in dem für jedes Hefepellet kalkulierten vorgewärmten Cracking-Puffer resuspendiert. Da PMSF schnell zerfällt wurde alle 15 Minuten 1 µl PMSF per 100 µl Cracking-Puffer hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in mit Glasperlen gefüllte Eppendorfgefäße transferiert. Dabei wird die Menge an Glasperlen festgelegt, in dem man den für jede Hefekultur errechneten Total OD<sub>600</sub> ebenfalls durch 7,5 dividiert und dann mit 80 multipliziert. Die Samples wurden im Heizblock bei 70° C für 10 Minuten erhitzt, und dann für eine Minute gründlich durchmischt. Danach für 5 Minuten bei 14000 UpM bei 4° C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Dieses wurde auf Eis gelagert. Das Pellet des ersten Gefäßes wurde bei 100° C für 3-5 Minuten erhitzt, dann für eine Minute suspendiert und wieder bei 14000 UpM für 5 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Gefäß mit dem ersten Überstand transferiert. Falls keiner oder nicht genügend Überstand erreicht wurde, wurden nochmals 50-100 µl Cracking-Puffer dazugegeben und die Schritte ab dem Erhitzen im 100° C kochenden Wasserbad wiederholt. Die Samples wurden kurz erhitzt und dann entweder gleich auf ein SDS/Elektrophorese-Gel geladen, oder bei -70° C eingefroren. Nachdem das SDS-Gel präpariert war, wurde der Proteinextrakt im Verhältnis 1:1 mit 2x Sample-Buffer gemischt, so dass pro Tasche ca. 15 µl geladen wurden. Das Gel lief bei 200 V für 40-60 Minuten und wurde dann bei 80 V für 1,5 Stunden auf die Membran geblottet. Die Membran wurde für 5 Minuten in Ponceau-Rot inkubiert, anschließend mit Wasser für 2 Minuten wieder entfärbt und dann für 30-60 Minuten in Blocking-Puffer geblockt. Dann in TBST (Tris-buffered-saline mit Tween 20 (0,1%)) 3x 5 Minuten gewaschen und mit dem ersten Antikörper, 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt, inkubiert. Da der von Clontech gegen die Gal4BD mitgelieferte Antikörper nur schwach bindet, musste die Membran über Nacht im Kühlraum inkubiert

werden. Die Membran wurde 3x 5 Minuten in TBST gewaschen und dann nochmals für 30 Minuten in mit 1:50 verdünntem Blocking-Puffer geblockt. Danach wieder 3x 5 Minuten in TBST gewaschen und für 45 Minuten mit dem zweiten Antikörper, 1:1000

**Abbildung 7. Western Blot ROMK-Gal4BD.**

Die Hefeklone 1-5 exprimieren das ROMK-Gal4-BD Fusionsprotein bei ca. 45kD. Rechts sind eine Negativ- und drei Positiv-Kontrollen zu sehen.



in Blocking-Puffer verdünnt, inkubiert. Danach wieder für 4x 5 Minuten in TBST gewaschen und mit ECL (Enhanced Chemolumineszenz)-Reagentien im Verhältnis 1:1 für 1 Minute inkubiert und dann auf einem Belichtungsfilm in verschiedenen Zeitabständen von 30 Sekunden bis 5 Minuten belichtet. Wie Abbildung

7. zeigt, exprimierten fünf Hefeklone das Fusionsprotein ROMK-Gal4BD. Klon 2, bzw. Klon 4 wurden zur Durchführung des „Yeast-Two-Hybrid“-Versuches verwendet.

**2.6.6. Amplifikation der cDNA-Bibliothek der Niere**

Um eine möglichst große Anzahl von mit dem Köder-Protein transformierten Hefezellen zu screenen, ist eine große Menge cDNA nötig. Diese cDNA wurde in Form einer Nieren-Bibliothek von Clontech bezogen und musste für den „Yeast-Two-Hybrid“-Screen amplifiziert werden. In einem Milliliter der Nierenbibliotheklösung sind ungefähr  $5,59 \times 10^9$  Klone. Ziel bei der Transformation der Bibliothek waren 40.000 Kolonien auf 10x15 cm Agarplatten zu erhalten. Bei einer Menge von 290 Agarplatten waren das  $11,6 \times 10^6$  Bakterienkolonien. Da jede Platte mit 200 µl transformierten Bakterien beimpft wurde, ergab sich ein Volumen von 58 ml.

Der Verdünnungsfaktor,  $\frac{11,6 \times 10^6}{58 \text{ml}} = \frac{5,59 \times 10^9}{1 \text{ml}}$  betrug 27.950.

Es wurde eine 1:1000 Relation der Nierenbibliothek festgesetzt. Dementsprechend ergaben sich 10 µl der cDNA Nierenbibliothek (1 ml :1000) und 9990 µl LB/Ampicillin-Medium. Als nächstes wurde von dem Zielvolumen von 58 ml der verbliebene Ver-

dünnungsfaktor von 27,95 errechnet. Es ergaben sich 2,08 ml, die aus den oben erwähnten 10 ml genommen wurden. Das restliche Volumen von 55,92 ml wurde mit LB/Ampicillin-Medium aufgefüllt. Dieses Volumen wurde am Ende auf die 290 LB/Ampicillin-Platten pipettiert, nachdem das Transformationsprotokoll von **Sambrook et al**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Second Edition, befolgt wurde. Ebenso wurden Titerplatten von 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungswerten angelegt, um die Transformationseffizienz zu überprüfen. Nach einer Nacht Inkubation bei 37° C wurden die Bakterienkolonien von jeder Agarplatte unter Anwendung von 5 ml 25% LB/Glycerol-Lösung abgekratzt. Am Ende waren 277 Platten von Bakterienkolonien befreit worden, und das totale LB/Glycerol-Volumen mit den suspendierten Bakterienkolonien belief sich auf 1116 ml. Dieses Volumen wurde auf Maxiprep-Flaschen aufgeteilt und für 10 Minuten bei 5000x g (5500 UpM) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 30 ml Resuspensions-Puffer resuspendiert. 30 ml Lysis-Puffer wurden hinzugefügt, die Suspension gut gemischt und bis zu 20 Minuten gewartet, bis sie aufgeklärt war. 30 ml Neutralisationspuffer wurden hinzugegeben und dann wieder für 15 Minuten bei 14000x g (9300 UpM) zentrifugiert. Der Überstand, ca. 80ml, wurde durch ein Mullgaze gefiltert und 40 ml 2-Propanol dem Überstand hinzugegeben. Wieder wurde für 15 Minuten zentrifugiert und jedes Pellet in 4 ml TE resuspendiert. Für die Plasmid-Purifikation wurden 12 Säulen auf eine Vakuumhaltermaschine gesteckt. Auf jede Säule wurden 10 ml Reinigungssharz gegeben. Dann wurde ein Vakuum angelegt bis die Flüssigkeit komplett verschwunden war. Es wurden 25 ml Waschlösung hinzugegeben, das Vakuum angelegt und dann 5 ml 80% Alkohol hinzupipettiert. Wieder wurde das Vakuum angelegt und noch für eine Minute angelassen. Die Säule wurde dann in einem 50 ml Gefäß für 5 Minuten bei 1300x g (2500 UpM) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule für 5 Minuten auf dem Vakuum getrocknet und dann in ein neues Gefäß transferiert. 1,5 ml vorerhitztes TE wurde hinzugegeben und für 1 Minute gewartet. Dann wieder für 5 Minuten bei 1300x g zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Die DNA wurde nochmals steril filtriert und die Konzentration bei OD<sub>260</sub> mit dem Spektrometer gemessen.

Die cDNA Library enthält insgesamt 3,5 Millionen verschiedener Klone. Bei der Amplifikation mussten mindestens 10 Millionen Bakterientransformanten erreicht werden, um die Bibliothek dreimal zu vervielfältigen. Da bei der ersten Runde aber durch-

schnittlich 20.000 Kolonien pro Platte wuchsen, und 277 Platten beimpft wurden, wurde eine zweite Runde der Amplifikation durchgeführt. Dabei wurden ebenfalls 20.000 Kolonien per Platte erreicht und 292 Platten beimpft, so dass am Ende 10 Millionen Klone erreicht, und die Bibliothek damit dreimal vervielfältigt wurde.

### **2.6.7. Transformation der cDNA-Bibliothek zum Köderkonstrukt**

Von den mit ROMK-Gal4BD-Konstrukt transformierten Hefestämmen AH109 und Y190 wurde eine 150 ml große Nachtkultur in YPD(A)-Medium angelegt. Als der  $OD_{600}$  von ca. 0,5 erreicht war, wurden die Hefezellen in sterilen, 250 ml großen Zentrifugationsflaschen bei 1000x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und die Zellen in 500 ml sterilem Wasser resuspendiert. Wieder wurden die Zellen für 5 Minuten zentrifugiert und dann in 8 ml sterilen 1xTE/LiAc resuspendiert. Eine frische PEG/LiAc-Lösung (100 ml) wurde hergestellt. Folgende Mengen wurden in zwei sterile 50 ml Gefäße pipettiert: 0,5 mg des ROMK-Gal4BD-Konstrukt, 0,25 mg der amplifizierten cDNA-Bibliothek der Niere, 20 mg Träger-DNA (Salmon Sperm), 8 ml kompetente Hefezellen, 60 ml PEG/LiAc-Lösung. Zwischendurch wurde die Suspension gründlich gemischt und nach Zugabe des PEG/LiAc bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 30° C und 200 UpM inkubiert. 7 ml DMSO wurden dazugegeben und die Suspension vorsichtig durchmischt. Danach erfolgte ein Temperaturschock für 15 Minuten bei 42° C im Wasserbad. Gelegentlich wurde die Suspension vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 1-2 Minuten auf Eis abgekühlt und dann bei 1000x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml 1x TE resuspendiert. Danach wurden die transformierten Hefezellen auf 15x10mm breiten  $Trp^-$ - $His^-$ - $Leu^-$  + 3AT (35 mmol) bzw.  $Trp^-$ - $His^-$ - $Leu^-$ - $Ade^-$  + 3AT (5 mmol) ausgestrichen. Die Platten wurden mit 200  $\mu$ l beimpft und für 7-10 Tage bei 30° C im Brutschrank inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu quantifizieren, wurden jeweils 100  $\mu$ l auf folgende 10x10mm Agarplatten ausgestrichen.

$Trp^-$ : Überprüfung, ob das Köder-Plasmid noch in der Hefezelle vorhanden ist

$Leu^-$ : Überprüfung, ob die Hefezelle das Fisch-Plasmid aufgenommen hat.

$Trp^-$ - $Leu^-$ : Überprüfung der Transformationseffizienz.



### 2.6.8. Bestätigung der Interaktion

Die Interaktion der Testproteine wurde sichergestellt, indem alle nach 7-10 Tagen auf den Dreifach- bzw. Vierfach-Selektionsplatten gewachsenen Kolonien gesammelt und wieder auf Selektionsplatten ausgestrichen wurden. Außerdem wurde jede Kolonie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem  $\text{Trp}^{-}\text{-His}^{-}\text{-Leu}^{-}\text{-Ade}^{-} + 3\text{AT}$  bzw.  $\text{Trp}^{-}\text{-Leu}^{-}\text{-His}^{-} + 3\text{AT}$ /Glycerol-Gemisch (50%) eingefroren. Kolonien die nach 7-10 Tagen im Brutschrank wieder auf den Selektivplatten gewachsen waren, wurden auf das Reporter-gen *lacZ* überprüft. Hierzu wurde ein 150 mm großes Filterpapier genommen und in 2,5-5ml Z-Buffer/X-Gal-Lösung eingeweicht. Dieses feuchte Filterpapier wurde in eine 150 mm große Petrischale platziert. Mit einer Pinzette wurde jeweils ein steriles Whatman#5 Filterpapier auf eine mit Hefekolonien bewachsene Agarplatte gelegt. Das Filterpapier wurde vorsichtig an den Agar gedrückt, um sicherzustellen, dass ein Teil der Hefekolonie kleben blieb. Nachdem der Filter ganz angefeuchtet war, wurde er mit den zum Teil dranhafenden Hefekolonien für ca. 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff gelegt. Der gefrorene Filter wurde kurz aufgetaut und dann, Kolonien nach oben, auf den mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Filter in die Petrischale gelegt. Die Petrischalen wurden bis zu 8 Stunden bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zwischendurch wurden die Hefekolonien auf eine Blaufärbung und damit eine mögliche Proteininteraktion überprüft. (Wenn es zu einer Protein-Protein-Interaktion kommt, wird das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen aktiviert. Dabei wird das chromophobe Substrat p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-Galaktose (X-Gal) hydrolysiert. Es setzt eine Blaufärbung der Hefekolonie ein, und die Proteininteraktion wird sichtbar). Der mögliche Farbumschlag und damit positive *lac-Z*-Test wurde zeitlich dokumentiert.

### 2.6.9. Überprüfung der Autoaktivierung der Interaktionsproteine

Wie in Kapitel 2.5. erwähnt, besteht die Möglichkeit der Autoaktivierung. In Kapitel 2.6.4. wurde bereits der Versuch der Überprüfung einer Autoaktivierung des Köderproteins beschrieben. Diese konnte ausgeschlossen werden. Um eine Autoaktivierung des Fisch-Plasmids zu überprüfen wurden sogenannte Kick-outs vorgenommen. Dabei wurde die Hefekolonie für ca. 24-36 Stunden bei 250  $\mu\text{M}$  und  $30^{\circ}\text{C}$  in 2 ml SD-Leu<sup>-</sup>-Lösung inkubiert. Es wurde versucht, den Selektionsdruck nur auf dem Fisch-Plasmid zu halten, damit die Hefezelle in den Teilungsprozessen das Köderplasmid verliert.

Damit war nur noch das Fisch-Plasmid in der Hefezelle enthalten, und weitere Autoaktivierungstest konnten vollzogen werden. Mit einer sterilen Inokulationsgabel wurde eine kleine Menge der Hefekolonie auf Trp<sup>-</sup>- und Leu<sup>-</sup>-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert und 10-15 Kolonien von den Leu<sup>-</sup>-Platten wiederum auf Trp<sup>-</sup> und Leu<sup>-</sup>-Platten ausgestrichen. Die Hefekolonien, die nur noch auf den Leu<sup>-</sup>-Platten, aber nicht mehr auf den Trp<sup>-</sup>-Platten wuchsen, wurden einem *lacZ*-Test (s. 2.6.8) unterzogen. Um auch die anderen Reportergene zu testen, wurden die gleichen Kolonien auch auf Leu<sup>-</sup>-His<sup>-</sup> + 3AT bzw. Leu<sup>-</sup>-His<sup>-</sup>-Ade<sup>-</sup> + 3 AT ausgestrichen und wiederum für ca. 7 Tage inkubiert. Falsch-positive Kolonien wurden aussortiert und wurden für weitere Untersuchungen nicht mehr verwendet.

#### **2.6.10. DNA-Extraktion aus der Hefezelle**

Eine Hefekolonie wurde in 5 ml SD-Leu<sup>-</sup> über Nacht wachsen gelassen und bei 5000x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl STET-Lösung resuspendiert. 100 µl feine Glasperlchen wurden hinzugefügt und die ganze Suspension für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Weitere 100 µl STET-Lösung wurden hinzugegeben und die Suspension für ca. 1 Minute homogenisiert. Danach wurde die Suspension für 3 Minuten in kochendem Wasser erhitzt und darauf folgend für einen kurzen Moment auf Eis abgekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1000x g für 10 Minuten, wurden 100 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, das schon 50 µl einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung enthielt. Das Gemisch wurde für eine Stunde bei - 20 °C gekühlt und dann bei 14000x g für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert. 100 µl Überstand wurden in ein neues, vorgekühltes Eppendorfgefäß, das mit 200 µl Ethanol (95%) gefüllt war, pipettiert. Um die DNA zu fällen, wurde die Suspension bei 14000x g für 15 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl Ethanol (70%) gewaschen, für weitere 15 Minuten zentrifugiert und dann in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.6.11. Herstellung kompetenter KC8-Zellen zur Elektroporation**

Da Hefe-DNA für eine Sequenzanalyse wenig geeignet ist, sollte Hefe-DNA in Bakterien transformiert werden. Da nur das Fisch-Plasmid (pACT2), in dem ein möglicher Interaktionspartner von ROMK, Protein X, interessierte, galt es, dieses zu isolieren. Dazu bediente man sich eines speziellen Bakterienstammes, der KC8-Bakterienzellen. Diese Bakterien tragen eine Mutation im *leuB* Gen. Da sie Leuzin und Thiamin nicht selbst synthetisieren können, mussten diese Nährstoffe im Agar enthalten sein. Eine andere Möglichkeit bestand nun darin, die Bakterienzelle mit dem Fisch-Vektor pACT2 zu transformieren. Dadurch erhielt sie die genetische Information zur Leuzinsynthese, und die Möglichkeit auf SD-Leu<sup>-</sup>-Agarplatten zu wachsen. Zur Herstellung kompetenter KC8-Zellen wurde eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium (Nährmedium für Bakterienkulturen) angesetzt. Diese wurde dann in 1000 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einem OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Die Kultur wurde in Zentrifugierflaschen gleichmäßig aufgeteilt und für 15 Minuten auf Eis gelagert. Dann für 15 Minuten bei 4000x g (5000 UpM) und 2° C zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 5 ml eiskalten Wasser resuspendiert, weitere 150 ml eiskühlten Wassers zu jeder Flasche hinzugegeben und für 20 Minuten bei 4000x g bei 2° C zentrifugiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt. Jedes Pellet wurde dann in 10 ml Glycerol (10%) resuspendiert und die Suspension für 10 Minuten bei 4000x g und 2° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2-3 ml Glycerol (10%) aufgelöst und in 1,5 ml Gefäßen zur Lagerung bei – 80°C aliquotiert.

### **2.6.12. Elektroporation der KC8-Bakterien für die Aufnahme der Hefe-DNA**

Für die Elektroporation wurden die Hefe-DNA und die kompetenten KC8-Bakterienzellen auf Eis aufgetaut. 2 µl Hefe-DNA wurden zu 50 µl kompetenten Zellen in einem vorgekühlten Eppendorfgefäß pipettiert. Die Suspension wurde für 1-2 Minuten auf Eis gelassen und dann in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (mit einem 2 mm großen Spalt) transferiert. Ein Impuls von 1.8 kV und 400 Ohm wurde appliziert, danach 1 ml SOC-Medium sofort hinzugegeben. Die Suspension wurde gut durchmischt und in ein 10 ml Gefäß pipettiert. Danach wurde die Suspension für 1 Stunde bei 37° C inkubiert und dann 10 µl bzw. 100 µl dieser Lösung auf M9/Ampicillin-Minimalmedium-

Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Es wurden von jedem Klon Minipräparationen, dem Protokoll von Qiagen folgend, angefertigt. Da KC8-Zellen endA-positive Bakterienstämme mit Nukleaseaktivität sind, wurden sie nach dem ersten kurzen Zentrifugieren von 30-60 Sekunden, zusätzlich mit 0,5 ml Puffer BP gewaschen und ebenfalls wieder zentrifugiert. Danach wurde mit der Hinzugabe von 0,75 ml Puffer PE das Protokoll weiter verfolgt.

### **2.6.13. Retransformation der cDNA der Interaktionsproteine**

Ein weiterer Schritt, die Interaktion des Protein X mit ROMK zu bestätigen, ist die direkte „Yeast-Two-Hybrid“-Methode. Dabei wurden die cDNA von ROMK und die cDNA von Protein X gleichzeitig zu untransformierten AH109-Zellen kotransformiert. Es wurden die aus den Hefezellen isolierten und in die KC8-Zellen transformierte cDNA aus dem Screen verwendet. Die Transformation lief wie unter Punkt 2.6.3 ab, wobei von der Köder-cDNA (ROMK-BD) und der cDNA von Protein X jeweils 100 µg verwendet wurden. Die transformierten Zellen wurden auf SD-Trp<sup>-</sup>, SD-Leu<sup>-</sup> und SD-Trp<sup>-</sup>-Leu<sup>-</sup>-Platten ausgestrichen. Nachdem Kolonien nach 3-4 Tagen auf SD-Trp<sup>-</sup>-Leu<sup>-</sup> gewachsen waren, wurden diese wiederum auf Dreifach-, SD-Trp<sup>-</sup>-Leu<sup>-</sup>-His<sup>-</sup> + 3AT, bzw. für den Hefestamm AH109 auf Vierfach-Selektionsplatten, SD-Trp<sup>-</sup>-Leu<sup>-</sup>-His<sup>-</sup>-Ade<sup>-</sup> +3AT ausgestrichen und für ca. 5 Tage inkubiert. So konnten Klone aussortiert werden, die kein Wachstum mehr zeigten; andere wiederum bestätigten eine mögliche Interaktion in vitro mit dem zytoplasmatischen Schwanz von ROMK (ROMK-c).

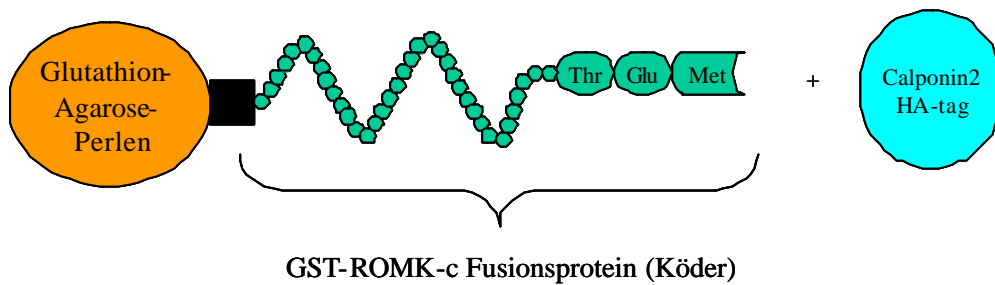
### **2.7. Technik des GST-Pull-Down-Experiment**

Das GST-Pulldown-Experiment beruht auf dem Prinzip der Affinitätspräzipitation, um Protein-Protein-Interaktionen in vitro zu testen, bzw. zu bestätigen (86, 87), (s. Abbildung 8.). Zuerst wurde ein Fusionsprotein aus dem zytoplasmatischen Teil von ROMK (ROMK-c) und dem Protein, Gluthatione-S-Transferase (GST), mit Hilfe des pGEX 4T3-Vektors, konstruiert. Dieses GST-ROMK-Fusionsprotein wurde dann mit Hilfe von Gluthation-Agarose-Perlen purifiziert. Das nun an die Perlen gebundene Fusions-

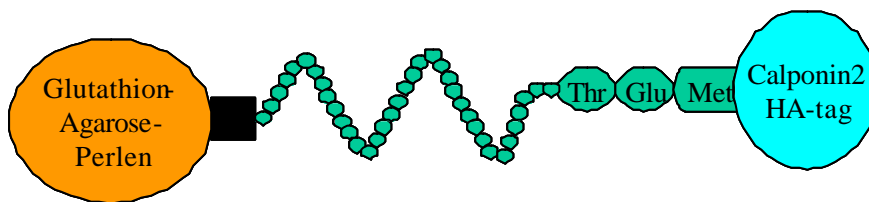
protein GST-ROMK diene als Köderprotein, um eine Interaktion mit anderen Proteinpartnern zu detektieren (A).

**Abbildung 8. Modell zu den GST-ROMK-Pull-Down-Experimenten**

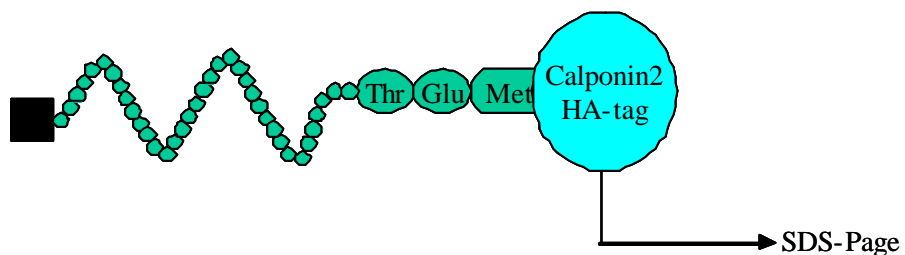
A) Das GST-ROMK-c Fusionsprotein mit der PDZ-Motiv ähnlichen Aminosäurefolge, Threonin-Glutamin-Methionin, ist an den Perlen immobilisiert und dient als Köder für Protein-Protein-Interaktionen. Hier als Beispiel das Protein Calponin2 mit HA-Tag.



B) Calponin2 mit dem HA-Tag hat an ROMK-c gebunden und ist immobilisiert. Nach mehreren Waschschrinen wurden ungebundene Partikel entfernt.



C) Die Interaktion beider Proteine wurde durch SDS-Page und Western Blot-Analyse mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper sichtbar gemacht.



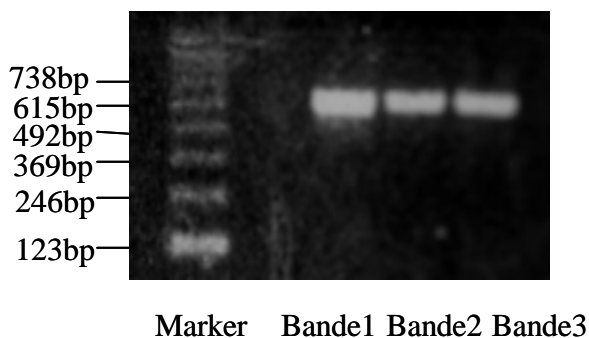
Die als möglichen Interaktionspartner dienenden Proteine X wurden direkt aus der Hezelle extrahiert und mit dem GST-ROMK-Fusionsprotein inkubiert (B). Im Falle einer Interaktion band Protein X an den zytoplasmatischen Teil von ROMK und wurde dadurch auf den Perlen immobilisiert (B). Nach der Inkubation wurden die Kügelchen mit dem gebundenem Fusionsprotein mit Pufferlösung mehrfach gewaschen, um alle unge-

bundenen Komponenten zu entfernen. Die möglichen Proteinkomplexe wurden von den Kügelchen eluiert und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel laufen gelassen. Da der Fisch-Vector, pACT2, ein HA-Tag besitzt, lagen alle Proteine X als HA-markiertes Fusionsprotein vor. Ein Western Blot mit einem Anti-HA-Antikörper zeigte dann, ob das GST-Fusionsprotein mit einem Partnerprotein co-präzipitiert werden konnte (C).

### 2.7.1. Konstruktion der GST-ROMK-cDNA

Um den gleichen Köder, wie er bei der Durchführung der „Yeast-Two-Hybrid“-Technik zur Anwendung kam, nutzen zu können, wurde das GST-ROMK-Fusionsprotein mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion konstruiert. Als Vorlage dienten die 600 Basenpaare des zytoplasmatischen Teil von ROMK, die aus dem Köder-Vektor pAS2-1 herausgeschnitten worden waren. Als Primer für die PCR dienten am 5'-Ende: CGGGATCCA CGTTCAGCAAGAATGCG und am 3'-Ende: CGAATTCTCGACGGATCCCTACA TCTG. Die PCR-Reaktion lief unter den gleichen Bedingungen ab wie bei der Herstellung des ROMK-Gal4BD-Fusionsproteins. Des Weiteren wurden zur Aufreinigung und

**Abbildung 9. Agarosegel des PCR-Produkts  
GST-ROMK cDNA**



Überprüfung des DNA-Konstruktes die gleichen Schritte angewandt, wie oben in 2.5.1. aufgeführt. Die cDNA wurde dann in den Vektor pGEX4T3 mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und Bam HI kloniert, wobei hier EcoRI am 3` und BamHI am 5` geschnitten haben. Für die Ligation und den Restriktionsverdau wurden ähnli-

che Ansätze, wie unter Punkt 2.6.1. erwähnt, gewählt. Die Sequenzierung der DNA übernahm wieder die Sequenzierungseinrichtung der Yale University. Als Primer wurden hierfür verwendet: 5'-Ende: GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG und am 3'-Ende: CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG. Nach dem Standardprotokoll von **Sambrook et al**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Second Edition, wurden spezielle Bakterienzellen, BL21 (Endoprotease negativ), mit dem DNA-

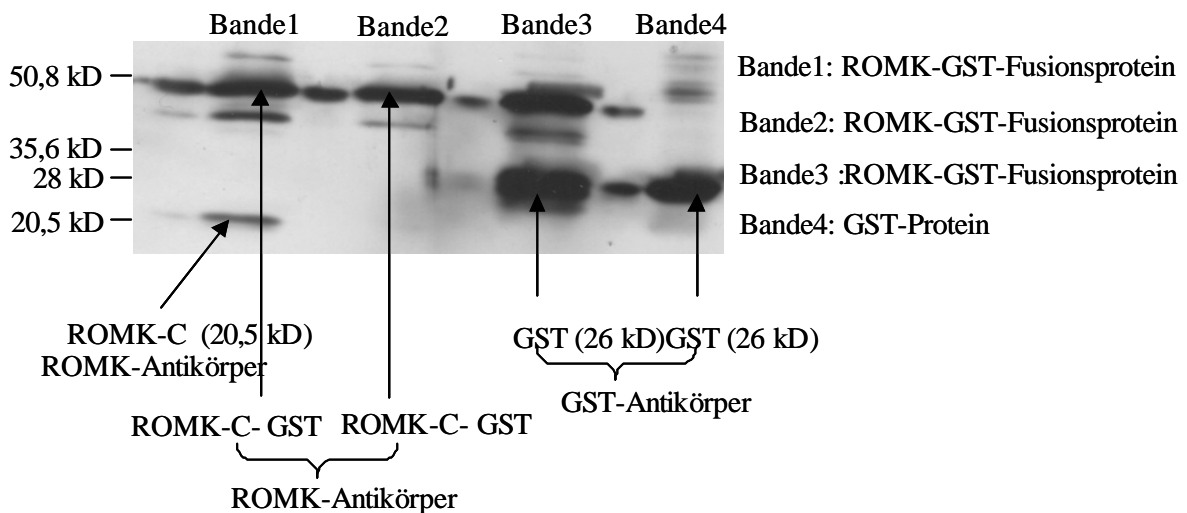
Konstrukt transformiert, auf LB/Ampicillinplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Diese Bakterien zeigen keine Endonuklease-Aktivität. Abbildung 9. zeigt das Ergebnis des GST-ROMK-cDNA PCR-Produkt. Alle drei Banden zeigen die cDNA auf der gewünschten Höhe im Agarosegel bei ca. 600bp.

### **2.7.2. Aufreinigung des GST-ROMK-Fusionsproteins**

Eine Bakterienkolonie wurde bei 37° C und 250 UpM über Nacht in LB/Ampicillin-Medium inkubiert und am nächsten Tag in ein größeres Volumen von 600 ml LB/Ampicillin transferiert. Die Kultur wurde bis zu einem OD<sub>600</sub> 1,5-2,0 bei 37° C wachsen gelassen. Nach dieser Inkubationszeit wurden 600 µl 100 mM IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranoside) hinzugegeben, das die Expression des Fusionsproteins stimuliert. Die Kultur wurde für weitere 3-6 Stunden bei 37° C wachsen gelassen und dann für 15 Minuten bei 4° C und 5000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml eiskalten PBS und 60 µl Protease-Inhibitor-Cocktail und 30 µl Aprotinin resuspendiert. Die Zellen wurden bei – 80° C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf Eis gelagert, im Kühlraum bei 4° C wieder aufgetaut und bei mittleren Impulswerten für 6-7 Mal jeweils 10-15 Sekunden Ultraschall-behandelt. Dann wurden 1,5 ml Triton-x-100 (20%) hinzugegeben und die Suspension im Kühlraum bei 4° C vorsichtig durchmischt. In dieser Zeit wurden die Sepharose-Perlen präpariert, indem 667 µl der Kügelchen bei 500x g und 4° C für 2 Minuten zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen und nochmals für 2 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Diese Bakterienzellsuspension wurde bei 10.000x g im Kühlraum für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig zu dem Gefäß mit den präparierten Kügelchen gegeben. Die Suspension wurde für 1 Stunde bei 4° C langsam gemischt und dann bei 500x g für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und das Pellet jedes Mal vorsichtig in 5 ml eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pelletvolumen gemessen und mit der gleichen Menge eiskaltem PBS resuspendiert und bei – 80° C eingefroren. Das gleiche Protokoll wurde verwendet, um auch das GST-Protein herzustellen, das als Negativ-Kontrolle für das Pull-Down-Experiment diente. Der Western Blot in

Abbildung 10. zeigt die erfolgreiche Herstellung des Fusionsproteins GST-ROMK. Als Antikörper gegen den zytoplasmatischen Teil von ROMK (ROMK-c) diente ein Anti-ROMK-Antikörper, und gegen das GST-Protein ein Anti-GST-Antikörper.

**Abbildung 10. Western Blot-Analyse des GST-ROMK-Fusionsprotein.**



### 2.7.3. Proteinextraktion aus der Hefezelle

Die Proteinextraktion aus der Hefezelle wurde wie in Abschnitt 2.6.5 beschrieben, durchgeführt. Alle zu testenden Klone wurden in 50 ml SD-Leu<sup>-</sup> wachsen gelassen. Da für dieses Experiment aber die Proteinstruktur für eine Interaktion mit ROMK wichtig ist, konnte der Cracking-Puffer aufgrund seiner proteinabbauenden Wirkung nicht zur Aufbrechung der Zellwände verwendet werden. Als Puffer wurde hierfür Hefe-Resuspensions-Puffer verwendet. Um eine optimale Proteinkonzentration zu erlangen, wurde die Hefezellsuspension in mit Glasperlen gefüllten Glas-Röhrchen (130mm x 100mm) mit rundem Boden viermal jeweils eine Minute durchmischt. Zwischenzeitlich wurden die Gefäße für 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Nach Wegnahme des Überstandes wurden noch einmal 100 µl Hefe-Resuspensions-Puffer zu den Kügelchen gegeben und für weitere 2 Minuten durchmischt. Der Überstand wurde zum ersten Überstand transferiert und für den nächsten Versuch sofort genutzt. Desweiteren wurden aus nicht transformierten Hefezellen Proteine isoliert, um beim Pull-Down-Experiment Bindungsstellen zu blockieren und damit unspezifische Hintergrundbindungen zu vermeiden.



#### **2.7.4. Durchführung der GST-ROMK-Pull-Down-Experimente**

Die Hälfte des Proteinextraktvolumens wurde für den Pull-Down-Versuch mit dem Fusionsprotein GST-ROMK, die andere Hälfte als Negativ-Kontrolle nur mit GST verwendet, um eine nichtspezifische Bindung auszuschließen. Das durchschnittliche Proteinvolumen lag bei 120  $\mu$ l, die auf eisgekühlte Eppendorfgefäße verteilt wurden. Zu den Proteinextrakten wurden 20  $\mu$ l GST-ROMK-Fusionsprotein und getrennt davon, 20  $\mu$ l GST-Protein hinzugegeben. Weiterhin wurden, um störende Hintergrundbindungen zu vermeiden, 80  $\mu$ l untransformierten Hefeproteinextrakts pro Eppendorfgefäß hinzugefügt. Der Inhalt der Eppendorfgefäße wurde für 1-2 Stunden im Kühlraum bei 4° C vorsichtig durchmischt. Die Eppendorfgefäße wurden für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Perlen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgeschüttelt und die Perlen dreimal mit 1 ml Perlen-Binde-Puffer gewaschen. Zwischenwischen wurde jeweils für eine Minute bei 4° C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand vollkommen entfernt und 25  $\mu$ l SDS-Sample-Puffer zu den Perlen gegeben. Die Gefäße wurden für 5 Minuten im Heizblock gekocht und das gesamte Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l auf ein SDS-Page-Gel (10%) geladen. Außerdem wurden noch 15  $\mu$ l des Proteinextrakts der einzelnen Protein X-Kandidaten geladen, um eine Information über das Molekulargewicht jedes einzelnen Interaktionspartners zu erlangen. Das Gel wurde bei 200 V für eine Stunde laufen gelassen, und die weiteren Schritte wurden, wie in Abschnitt 2.6.5. geschildert, vorgenommen. Inkubations- und Waschzeiten wurden variiert. Ein polyklonaler Anti-HA-Antikörper wurde für 2-3 Stunden mit der Membran inkubiert und die Waschschrte mit Blocking-Puffer und TBST wie folgt gewählt. Die Membran wurde dreimal in TBST gewaschen, 1x 5 Minuten, 2x 10 Minuten und 1x 15 Minuten, dann 30 Minuten in Blocking-Puffer geblockt. Danach wurde für 45 Minuten mit dem zweiten Antikörper, (Anti-Maus, 1:1000 verdünnt in Blocking-Puffer), inkubiert. Die Membran wurde danach 4x in TBST gewaschen, 3x 5 Minuten und 1x 10 Minuten. Die ECL-Reagentien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und der Blot für ca. 1 Minute inkubiert. Der Film wurde je nach gewünschter Darstellungsintensität zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten mit der Membran belichtet.

## **2.8. Immunfluoreszenz**

Die Fluoreszenzmikroskopie nutzt das Fluoreszenzphänomen, um spezifisch ausgewählte Zellbestandteile scharf (mit hohem Kontrast), d.h., von anderen Komponenten abgegrenzt, sichtbar zu machen. Fluoreszenz ist die Eigenschaft von bestimmten Molekülen bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge selbst Licht zu emittieren. Es besteht die Möglichkeit, die DNA zweier Proteine in eine Zelllinie zu transfizieren und Aussagen über mögliche Kollokalisierung oder Änderungen des Lagemusters einzelner Proteine zu treffen. Dabei werden die Proteine von einem Antikörper direkt erkannt oder aber ein im Säuger-Expressions-Vektor enthaltenes Myctac oder HA-Epitop von einem anderen Antikörper gebunden. Der zweite, ein fluoreszierender Antikörper, bindet an den ersten und kann im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. So war es möglich, eine Interaktion von ROMK mit Protein X in den COS-Zellen darzustellen. Dazu wurden die cDNA des gesamten ROMK-Proteins mit dem gesamten Protein X in COS-Zellen transient kotransfiziert, anschließend mit einem an den C-terminalen Schwanz von ROMK, bzw. an Protein X bindenden Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper wurde wiederum von einem zweiten Antikörper, (Anti-Hase, gegen den Anti-ROMK-Antikörper) oder einem spezifischen für den gegen das Protein X gerichteten ersten Antikörper, erkannt. Diese zweiten Antikörper emittieren, wenn angeregt, Licht in unterschiedlicher Wellenlänge. ROMK erscheint im Fluoreszenzmikroskop rot und Protein X grün. So kann eine mögliche Kollokalisierung von ROMK und Protein X in der Zellkultur bestimmt und auch quantifiziert werden. Des Weiteren war es möglich, Aussagen darüber zu treffen, ob ROMK seine Lokalisation und sein charakteristisches Immunfluoreszenz-Muster ändert.

## **2.9. COS-Zellen**

Transiente Expression von Genen in COS-Zellen ist eine aussagekräftige und häufig angewendete Methode für die Produktion von Proteinen in kurzer Zeit. Daher kann eine mögliche Kollokalisierung von Proteinen in Zellen dargestellt werden. Die für die transiente Transfektion verwendeten COS-Zellen stammen von dem afrikanischen, grünen Affen (African Green Monkey) ab. Für die Expression ist der SV 40 large T Antigen

Promotor zuständig. Es gibt drei verschiedene COS-Stämme, Typ 1,3 und 7. Für die Immunfluoreszenzstudien wurden COS-7-Zellen der zehnten Generation verwendet.

### **2.9.1. Transfektion der cDNA in COS-7-Zellen**

Zur Transfektion wurde Perfect Lipids von Invitrogen verwendet. Damit konnte eine hohe Transfektionseffizienz und eine größere Reproduzierbarkeit erreicht werden als mit anderen Methoden. Für die Transfektion wurden COS-7-Zellen der zehnten Generation, die bis zu 50-60% konfluent waren, verwendet. Diese wurden trypsinisiert und gesplittet und in 12-Well-Platten bei 37° C im CO<sub>2</sub>-Inkubator wachsen gelassen, bis zum Tag der Transfektion eine ungefähre Konfluenz von 50-60% erreicht war. Diese Zellen wurden dann in sogenanntes Komplettes Medium verteilt. Am zweiten Tag der Transfektion wurde eine 1 mg/ml Stamm-Lösung von Plasmid-DNA aus Maxipräparationen vorbereitet. Die cDNA der Klone wurden von kollaborierenden Laboratorien bezogen. Dabei wurde für die Transfektion die komplette cDNA der Proteine POSH (Department of Pathology and Center for Neurobiology, College of Physicians, Columbia University, New York, USA), Dia2 (Art Alberts, Grand Rapids, Michigan, USA), Hef1 (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA), NUMB2 (Laboratory of Neural Stem Cell Research, Robarts Research Institute, London, Ontario, Canada), Shank3a (Howard Hughes Medical Institute, Neurobiology, Massachusetts General Hospital, Harvard, Medical School, USA) und Arg/AblBP2 (Department of Medical Oncology, Philadelphia, Pennsylvania, USA) verwendet. Lipid und Plasmid-DNA wurden getrennt voneinander in 0,5 ml Serum-freiem-Medium präpariert, so dass sie im Verhältnis 6:1 bzw. 7:1 später zusammengefügt werden konnten. Dabei wurden 2 µg Plasmid-DNA und 12 µg Lipid verwendet. COS-Zellen wurden in 1 ml PBS Well gewaschen, um Serum zu entfernen. Danach wurde die Transfektionslösung hinzugegeben, und die Zellen für weitere 4 Stunden im Inkubator inkubiert. Die Transfektionslösung wurde entfernt und durch 1 ml Kompletten Mediums pro Well ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden für weitere 24-72 Stunden bei 37° C inkubiert.

### **2.9.2. Fixieren der Zellen und Inkubation mit Antikörpern**

Die Zellen wurden mit PBS++ gewaschen und mit Formaldehyd (4%) für 30 Minuten fixiert; danach wieder mit PBS++ 3 Mal für 5 Minuten gewaschen. Die Zellen wurden mit 1x GSDB für mindestens 30 Minuten inkubiert. Die fixierten Zellen wurden für eine Stunde mit dem ersten Antikörper (1:60- 1:120) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie mit Permeabilisations-Puffer 3 Mal gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (1:60- 1:120) in GSDB für 45 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder 3 Mal in PBS++ und anschließend einmal in 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Die Deckgläser mit den fixierten Zellen wurden mit Nagellack an den Rändern luftdicht verschlossen, im Fluoreszenzmikroskop auf mögliche Kolo-kalisation untersucht und dann im Kühlraum aufbewahrt.

### **3.0. Ergebnisse**

#### **3.1. Allgemeine Übersicht über die möglichen Interaktionspartner aus dem „Yeast-Two-Hybrid“-Screen**

Es wurden sechs „Yeast-Two-Hybrid“-Screens durchgeführt. Die ersten drei waren erfolglos. Nach einer Inkubationszeit der Platten von bis zu 10 Tagen waren keine Hefekolonien auf den  $\text{Trp}^-$ - $\text{Leu}^-$ - $\text{His}^-$  + 3 AT-Selektionsplatten zu erkennen. Ebenso zeigten die Titerplatten,  $\text{Trp}^-$ - $\text{Leu}^-$ , die die Transformationseffizienz quantifizieren, kein Wachstum von Hefekolonien. Dafür wuchsen Kolonien auf den jeweiligen Single-Kontrollplatten  $\text{Leu}^-$  und  $\text{Trp}^-$ . Diese Platten zeigen an, ob das Fisch-Plasmid aufgenommen bzw. die Hefezellen bei der Transformation starben, oder das Köderplasmid verloren haben. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass nur jeweils ein Plasmid aufgenommen wurde, beide Plasmide zeitgleich zusammen wurden in der Hefezelle nicht toleriert. Daher konnte dieser am Anfang zur Transformation dienende Hefeklon für weitere Experimente nicht mehr verwendet werden. Wie im Ergebnis des Western Blots im Abschnitt 2.6.5. gezeigt, bestand die Möglichkeit, zwischen fünf verschiedenen, erfolgreich mit dem Köder-Fusionsprotein ROMK-BD transformierten Hefeklonen, zu wählen. So wurde der „Yeast-Two-Hybrid“-Screen mit einem anderen Klon zwei weitere Male wiederholt. Auch wurde die Köder-cDNA in den neuen Hefestamm AH109 transformiert. Die Vorteile, die dieser Stamm gegenüber dem älteren Y190 bietet, sind in Abschnitt 2.5. bereits aufgelistet. Auch mit diesem transformierten Hefestamm wurde ein Screen durchgeführt, so dass insgesamt drei Library-Transformationen vollzogen wurden. Bei allen dreien waren die Transformationseffizienzen niedrig. Im ersten Screen wurden auf den Titerplatten nur 714.600 Kolonien, bei dem zweiten nur 72.660 und bei dem dritten Screen 139.360 Hefekolonien gezählt. Damit war nur 1/10 der cDNA-Nieren-Bibliothek abgedeckt. Nach Durchführung des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays auf allen Selektionsplatten und dem darauffolgenden nochmaligen Ausstreichen von blaugefärbten, großgewachsenen Kolonien auf Selektionsplatten, konnte die Anzahl von positiven Hefeklonen, und damit möglichen Interaktionspartnern, von 221 auf 174 reduziert werden. Bei 47 positiven Klonen konnte die Interaktion also nicht bestätigt werden. Von allen übrigen 174 Hefekolonien wurde die DNA isoliert, sequenziert und in einer Datenbank auf ihre Bedeutung hin analysiert. Aus zeitlichen Gründen fand dieser

Schritt noch vor der weiteren Eliminierung falsch-positiver Klone durch Auto- bzw. nicht-spezifische Autoaktivierungstests statt. Daher war es möglich, die Proteine in Gruppen zu gliedern und einen kleinen Kreis von 17 möglichen Interaktionspartnern auszuwählen, die auf die Regulation und Funktion von ROMK Einfluss haben könnten. Eine kurze Beschreibung aller Proteine ist aus nachfolgender Tabelle ersichtlich.

	<b>Name des Proteins</b>	<b>Beschreibung des Proteins</b>
1	H. S. Calponin2	Aktin-bindendes Protein
2	H. S. Calponin2	Aktin-bindendes Protein
3	Rat. Norveg. Shark postsyn. Density Protein	Protein mit multiplen Interaktionsdomänen, u.a. PDZ
4	H. S. epithelial protein up regulation	mit PDZ Motiv, im proximalen Tubulus lokalisiert
5	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
6	H. S. NUMB isoform 2	Protein mit multiplen Interaktionsseiten
7	H. S. Cytochrom C	mitochondriales Enzym
8	H. S. mRNA for KIAA 1267 protein	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
9	PAX, paired box	Transkriptionsfaktor
10	H. S. Antiquitin1	reguliert den Turgordruck
11	H. S. Cytochrom b245	mitochondriales Enzym
12	H. S. disabled 2p 93	Tumor-Suppressor-Protein, dient auch als Adapterprotein
13	Rat.norvegic.mRNA for SECS binding prot.	kloniertes, noch nicht charakterisiertes Protein
14	H. S. novel centrosomal protein RAN	im Zentrosom lokalisiertes Protein, reguliert den Zellzyklus und Mikrotubuli
15	H. S. Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -exchanger regulation	Protein mit 2 PDZ-Domänen
16	H. S. cDNA FLJ 10707,fis	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
17	H. S. Fc-Fragment of IgG	Fragment eines IgG-Antikörpers
18	H. S. FLJ 200 75 fis, clone	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
19	H. S. Antiquitin1	reguliert den Turgordruck
20	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
21	H. S. JTV1 gen	hypothetisches DNA-Reparaturprotein
22	H. S. enhancer filamentation 1	Tyrosinkinase-assoziiertes Protein mit SH3-Domänen
23	H. S. 59 protein 3' end	kloniertes, noch nicht charak-

		terisiertes Protein
24	H. S. plasminogen mRNA	Plasminogen
25	Adenovirus	Teil einer Adenovirussequenz
26	H. S. JTV1 gen	hypothetisches DNA-Reparaturprotein
27	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
28	H. S. Chromosom 19	Chromosom
29	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
30	H. S. v- maf musculoaponeurotic fibrosarcoma	Onkogenhomolog
31	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
32	Chromosom	Chromosom
33	H. S. HSPC 183 mRNA, PTD 017 mRNA	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
34	H. S. ski-interacting protein, nuclear receptor.	Transkriptionsaktivator
35	H. S. Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Exchanger	Protein mit 2 PDZ-Domänen
36	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
37	H. S. Calponin2	Aktin-bindendes Protein
38	H. S. E21G1 mPNA/ H.S. protein kinase H11	am Zellwachstum beteiligtes Protein mit Autokinaseaktivität
39	H. S. basic leucin zipper	Transkriptions-Aktivator
40	H. S. JTV1 gen	hypothetisches DNA-Reparaturprotein
41	H. S. connective tissue growth factor	Transkriptionsfaktor
42	H. S. phosphoserine Aminotransferase	Aminotransferase
43	H. S. nuclear pore complex interaction protein	Protein, das an der Zellkernpore lokalisiert ist
44	H. S. centromere autoantigen C	Zentrosom-assoziiertes Protein
45	H. S. Calponin2	Aktin-bindendes Protein
46	H. S. for inositol 1,4,5 triphosphate	Tyrosinkinase
47	H. S. putative cyclin G1-interacting protein	In den Zellzyklus eingreifendes Protein
48	H. S. partial DNA sequence	Chromosom
49	H. S. partial DNA sequence	Chromosom
50	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
51	H. S. JTV1 gen	hypothetisches DNA-Reparaturprotein
52	human connective tissue growth factor	Transkriptionsfaktor
53	H. S. Cytochrome b	mitochondriales Enzym
54	H. S. nuclear pore complex interacting	an der Zellkernpore lokalisiertes Protein

55	H. S. nuclear matrix protein 55	Tumormarkerprotein bei Blasenkarzinomen
56	H. S. centromere autantigen C	Zentrosom-assoziiertes Protein
57	H. S. Calponin2	Aktin-bindendes Protein
58	H. S. for inositol 1,4,5 triphosphate	Tyrosinkinase
59	H. S. splicing factor 3b, subunit	Splicefaktor
60	Mus musculus diaphanous related form	involviert in Aufbau und Organisation des Zytoskeletts
61	H. S. clone 24877 mRNA	hypothetisches Protein, das als DNA-Reparaturprotein vorkommt
62	H. S. staufen protein (STAU)	RNA-bindendes und -transportierendes Protein
63	H. S. Cytochrom b	mitochondriales Enzym
64	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
65	Saccaromyces cerevesciae chromosom 16	Hefechromosom
66	Mus musculus plenty of SH3	Protein mit multiplen SH3-Domänen
67	H. S. Margo homolog mRNA	kloniertes, noch nicht charakterisiertes Protein
68	H. S. Gene from PAC 426I6	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
69	H. S. Gene from PAC 426I6	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
70	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
71	H. S. mRNA, cDNA DKTZp 586AO	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
72	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
73	H. S. NUMB isoform 2	Protein mit multiplen Interaktionsdomänen
74	H. S. cDNA FLJ 20406 fis, clone	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
75	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
76	H. S. Translation initial factor 3	Protein, das an der Initiation der Translation beteiligt ist
77	H. S. betaine-homocyst-S-methyltransferase	mitochondriales Enzym
78	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
79	Human mitochondria	mitochondriales Enzym
80	H. S. mRNA; cDNA DKF Z p586P1	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
81	H. S. Cytochrome b	mitochondriales Enzym



82	H. S. aldolase B, fuctose-biphosphatase	mitochondriales Enzym
83	H. S. genomic chromosome	Chromosom
84	mRNA for KIAA 0058 gene	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
85	H. S. inhibitor of DNA binding 1	Transkription-inhibierendes Protein
86	H. S. KIAA 0152 gene product	hypothetisches Protein
87	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
88	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
89	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
90	H. S. ribosomal DNA-complete	Chromosom
91	H. S. Cytochrome C	mitochondriales Enzym
92	H. S. Chromosom 16	Chromosom
93	H. S. Polymerase	Enzym
94	H. S. Deleted in oral-cancer 1	Tumor-Supressor-Protein
95	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
96	H. S. Actin Beta (ACTB) mRNA	Aktinprotein des Zytoskelett
97	H. S. acidic Calponin3	saure Form von Calponin
98	H. S. disabled 2p 93	Tumor-Supressor-Protein
99	H. S. selenprotein P, plasma, 1	Selenprotein P
100	H. S. TNF-recept.associat.factor, MLN 62mR	TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein
101	H. S. IGFBP-4, Insulin growth factor	Transkriptionsfaktor
102	Transkriptionfaktor	Transkriptionsfaktor
103	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
104	Genomic sequence from human 9p34: mRNA for elongation factor	Chromosom
105	H. S. WDR protein	ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt
106	H. S. insulin growth factor	Transkriptionsfaktor
107	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
108	H. S. DEAD/H Asp-Glu-Ala-asp/His mRNA for prot p68	RNA-Helikase-Protein
109	H. S. Cytochrome b	mitochondriales Enzym
110	H. S. for L-arginine glycine aminotransferase	mitochondriales Enzym
111	Cytochrome b	mitochondriales Enzym
112	H. S. mRNA,cDNADKFZp434A0312,G-protein	Protein mit Ähnlichkeit zu einem G-Suppressor-Protein
113	H. S. clone C4E1.63, Human Chromosome 14	Chromosom
114	H. S. HSPC 017 mRNA, Chromosome 17	Chromosom
115	H. S. HSPC 017 mRNA, Chromosome 17	Chromosom

116	H. S. NADH-dehydrogenase	mitochondriales Enzym
117	H. S. NADH-dehydrogenase	mitochondriales Enzym
118	DNA seq from clone RP1-309,H.S.tiss.inhibitor for metalloprotease 3	hypothetisches Protein mit Ähnlichkeit zu einem Inhibitor der Metalloprotease 3
119	H. S. Cytochrome b245	mitochondriales Enzym
120	mRNA for KIAA 0771	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
121	H. S. centrosome associated protein	Zentrosom-assoziiertes Protein
122	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
123	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
124	H. S. renin mRNA	Renin-assoziiertes Protein
125	H. S. Plasminogen	Plasminogen
126	BCC5-Cys2-His Zinc finger transcription	Transkriptionsfaktor
127	H. S. JTV 1-gen	hypothetisches DNA-Reparaturprotein
128	H. S. Potassium gated channel	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
129	H. S. connective tissue growth factor	Transkriptionsfaktor
130	H. S. lrp mRNA	Protein mit möglicher Beteiligung am nukleozytoplasmatischen Transport
131	H. S. JTV1 gen	hypothetisches DNA-Reparaturprotein
132	H. S. A-acetyltransferase	mitochondriales Enzym
133	H. S. CPC-island DNA genom MSE1	tRNA-Synthetase
134	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
136	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
137	H. S. basic leucin zipper	Transkriptionsfaktor
138	H. S. Arg/Abl Interacting protein	Tyrosinkinase-assoziiert
139	H. S. Arg/Abl Interacting protein	Tyrosinkinase-assoziiert
140	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
141	H. S. aldolase	mitochondriales Enzym
142	H. S. acetyl-coenzyme	mitochondriales Enzym
143	H. S. fructosebiphosphatase	mitochondriales Enzym
144	H. S. plasminogen	Plasminogen
145	H. S. heat shock protein	Hitzeschockprotein
146	H. S. mRNA, cDNA DKFZp5643H2	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein

147	H. S. Zink finger Protein	Transkriptionsfaktor
148	H. S. 12q24;1 BAC RPC11 946P	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
149	H. S. insuline like growth factor	Transkriptionsfaktor
150	H. S. cDNA DKFZp434L1	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
151	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
152	H. S. NADH-dehydrogenase	mitochondriales Enzym
153	H. S. acetyl-coenzyme A	mitochondriales Enzym
154	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
155	H. S. Gene from PAC 426I6	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
156	H. S. Gene product KIAA 0152	hypothetisches Protein
157	H. S. connective tissue growth factor	Transkriptionsfaktor
158	H. S. Actin Beta (ACTB) mRNA	Aktin des Zytoskeletts
159	H. S. plasminogen	Plasminogen
160	H. S. Deleted in oral cancer1	Tumor-Suppressor-Protein
161	H. S. insulin growth factor	Transkriptionsfaktor
162	H. S. acidic Calponin3	saure Form von Calponin
163	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
164	H. S. betaine metyhyltransferase	mitochondriales Enzym
165	H. S. Putative cyclin G1 interactin	Protein, das in die G1-Phase des Zellzyklus eingreift
166	H. S. mRNA for KIAA 0298	noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein
167	H. S. for integrase interactor 1b protein	kloniertes, noch nicht charakterisiertes Protein
168	H. S. triple functional domain (TRIO)	Multidomänen-Protein
169	H. S. Early B-cell transcript	Transkriptionsfaktor
170	H. S. seq from human 9p34, elongation factor	Elongationsfaktor
171	Sequenzieren und Identifikation der DNA nicht möglich gewesen	
172	über Datenbank keine Identifikation des Proteins möglich gewesen	
173	H. S. aquaporin 1	Wasserkanal
174	H. S. Pump 1 gene encoding PUMP	kloniertes, noch nicht charakterisiertes Protein

### 3.1.1. Einteilung der möglichen Interaktionspartner in Gruppen

Nach Literaturstudien lassen sich die aus den „Yeast-Two-Hybrid“-Screens isolierten Proteine in mehrere Gruppen aufteilen (s. 3.1.2.). Dabei bilden Proteine, die in die Organisation des Zytoskeletts involviert sind, die erste Gruppe. Proteine, die Domänen für Protein-Protein-Interaktionen aufweisen oder als Scaffold-Proteine dienen, bilden die zweite. Die dritte Gruppe stellen Proteine dar, von denen schon bekannt ist, dass sie auf Kanäle regulatorisch wirken können. Die vierte Gruppe bilden Kanäle. Weitere Proteingruppen, wie mitochondriale Proteine, Transkriptionsfaktoren oder auch Sequenzen von diversen Chromosomen wurden aufgrund ihrer fehlenden Einflussmöglichkeiten oder mangelnder Beziehung zu ROMK nicht weiter berücksichtigt und bestimmt. Das gleiche gilt für Proteine, die in ihrer Funktion nicht mit der Regulation und Funktionssteuerung von Kanälen in Verbindung gebracht werden können, sowie Proteine, deren cDNA die Datenbank nicht identifizieren konnte. Auch die nähere Charakterisierung der Interaktion von ROMK mit hypothetischen Proteinen wurde nicht weiter verfolgt.

### 3.1.2. Festlegung auf Proteine, die für eine Protein-Protein-Interaktion in Frage kommen

Proteine der Gruppen 1-4 sind für Protein-Protein-Interaktionen mit ROMK interessant. Insgesamt kamen 17 Proteine für weitere Untersuchungen in Frage, da sie keine Autoaktivierung nach den Kick-Out-Versuchen des Köders zeigten. Sie wurden weiter spezifiziert.

**Gruppe 1:** Calponin2 (Klone 1, 2, 37, 45, 57) (55, 56), NUMB2 (Klone 6, 73) (67, 68), HEF1 (Klon 22) (60, 61, 62), ArgBP2 (Klone 138, 139) (69), Skank3a (Klon 3) (63, 64, 65), DRF (Klon 60) (58, 59), WDR1 (Klon 105) (77), TRIO (Klon 168) (76), Beta Actin (Klone 96, 158) (78), Acidic Calponin (Klone 97, 162) (57)

**Gruppe 2:** NUMB2 (Klone 6, 73) (67, 68), HEF1 (Klon 22) (60, 61, 62), ArgBP2 (Klone 138, 139) (69), Skank3a (Klon 3) (63, 64, 65), POSH (Klon 66) (66), WDR1 (Klon 105) (77)

**Gruppe 3:** IT (Klone 46, 58) (79), Skank3a (Klon 3) (63, 64, 65), POSH (Klon 66) (66), Map17 (Klon 4) (71), NHERF2 (Klone 15, 35) (70), ArgBP2 (Klone 138, 139) (69), TRIO (Klon 168) (76)

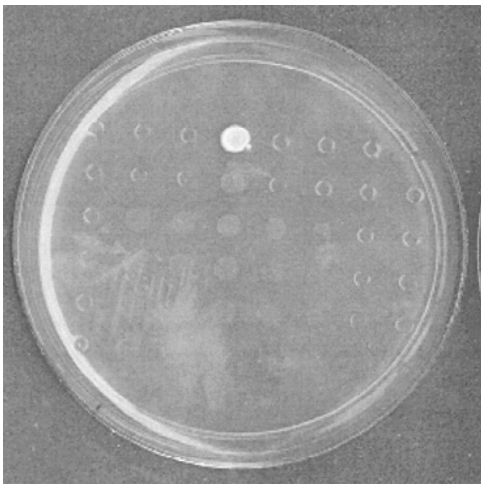
**Gruppe 4:** KvLQT1 (Klon 128) (74, 75), Aquaporin1 (Klon 173) (72), Antiquitin1 (Klone 10, 19) (73)

### **3.1.3. Einschränkung der Interaktionsproteine nach Autoaktivierungstests und direkten „Yeast-Two-Hybrid“-Versuchen**

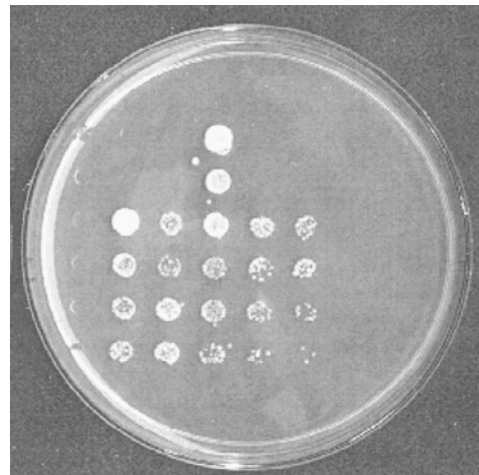
Wie aus den Recherchen ersichtlich wurde, tragen viele dieser möglichen Interaktionspartner SH3-Domänen. Da ROMK aber keine prolinreiche Region in seinem C-terminalen Ende aufweist, musste ausgeschlossen werden, dass das Fisch-Plasmid nicht an die BD-Domäne bindet, ohne dabei mit ROMK zu interagieren. Um diese nicht-spezifische Aktivierung auszuschließen und um die Anzahl der Interaktionspartner zu reduzieren, wurden das Köderplasmid pAS2-1 (BD) und die cDNA von den interessanten Proteinen (Protein X) in den Hefestamm AH109 kotransformiert (s. Abbildung 11). Dabei zeigten nur Hefezellen, die mit der cDNA von H.S. Actin Beta (Klone 96 und 158) transformiert wurden, auf Selektionsplatten Wachstum und damit eine nicht-spezifische Aktivierung. Um die Interaktion zwischen Protein X und ROMK nochmals zu untermauern, wurde ein direkter „Yeast-Two-Hybrid“-Versuch durchgeführt, indem die cDNAs von ROMK und Protein X zeitgleich transformiert wurden. Nach Durchführung der Kotransformation zeigten nur die Transformanten von ROMK und WDR1 (Klon 105) sowie ROMK und TRIO (Klon 168) auf den  $\text{Trp}^-$ - $\text{Leu}^-$ - $\text{His}^-$ - $\text{Ade}^-$  + 3AT-Selektionsplatten kein Wachstum und damit auch keine Interaktion (s. Abbildung 12.). Auch nach Wiederholung des Versuches waren keine Kolonien bei diesen beiden Klonen auf den Selektionsplatten zu finden. Bei allen anderen Bindungspartnern konnte die Interaktion im direkten „Yeast-Two-Hybrid“-Test reproduziert und auch gezeigt werden, dass keine unspezifische-Aktivierung von Protein X mit der Gal4-BD-Domäne vorlag. Zusätzlich wurde noch überprüft, welcher Teil der cDNA des Protein X bei Durchführung des „Yeast-Two-Hybrid“-Versuches an ROMK gebunden hat. Dabei wurde anhand des Sequenzierungsergebnisses festgestellt, welcher Teil der cDNA der

Proteine X in der Hefezelle translatiert wurde. Es zeigte sich, dass die Inositol-1,4,5-trisphosphat-Kinase (IT) (Klone 46 und 58) nicht an ROMK binden konnte. Bei der Sequenzanalyse mit anschließender Datenbanksuche wurde die Kinase zwar angezeigt, ihre cDNA-Sequenz lag aber außerhalb des translatierten Teils. Damit war nicht die Kinase das Protein, das mit ROMK interagiert. Daher war auch dieser Klon falsch-positiv. Es reduzierten sich die aussichtsreichen Proteine von 17 auf 13 Klone.

**Abbildung 11. Testung von nicht-spezifischer Aktivierung durch Kotransformation der BD (pAS2-1) und Protein X (pACT2) in AH109. Klon 96, H. S. Actin Beta wuchs auf der Selektionsplatte, verfärbte sich blau und zeigte damit eine nicht-spezifische Aktivierung.**



**Abbildung 12. Bestätigung der Interaktion zwischen ROMK-BD und Protein X durch direkten „Yeast-Two-Hybrid“-Versuch. Hefekolonien, die auf den Selektionsplatten wuchsen und sich blau färbten, bestätigten die Interaktion zwischen den Proteinen.**



### **3.2. Allgemeine Charakterisierung der für die weiteren Versuche ausgewählten Proteine**

Proteine, die in die Organisation und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert und möglicherweise regulatorisch auf ROMK wirken (Gruppen 1 und 3)

Calponin2 (Klone 1, 2, 37, 45, 57) ist ein Troponin t-ähnliches Protein der glatten Muskulatur. Es bindet an Aktin, Myosin, Tropomyosin und Ca<sup>2+</sup>-bindende Proteine. Es re-

guliert die Interaktion von Aktin und Myosin in glatten Muskelzellen, ist an der Kontrolle des Neuritenwachstums und an der Organisation und der Stabilisierung des Zytoskeletts anderer Zellarten beteiligt (55, 56).

Acidic Calponin (Klone 97, 162) stellt eine saure Form von Calponin dar. Es ist auch am Aufbau des Aktin-Zytoskelett involviert (57).

DRF (Klon 60) ist relevant für die Zytokinese, für die Formation von Stress-Fasern und ist Src-Tyrosinkinase-assoziiert. Desweiteren verbinden die Mus musculus diaphanous related form (DRF) die Transkriptionsfaktoren Rho und Src während der Signaltransduktion und der Regulation der Aktinfilamente (58, 59).

Proteine, die Interaktionsdomänen tragen und möglicherweise regulatorisch auf ROMK wirken (Gruppen 2 und 3)

NUMB2 (Klone 6, 73) ist ein membran-assoziiertes Protein. Es verfügt über eine Phosphotyrosin-bindende Domäne und mehrere SH3-Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen modulieren. Es wird in den meisten menschlichen Geweben exprimiert und ähnelt einem Scaffold-Protein (67, 68).

NHERF2 (Klone 15, 35) ist ein zwei PDZ-Domänen tragendes Protein, das mit den C-terminalen Enden anderer Proteine interagiert. Dazu gehören u. a. PLC-beta3, NHE3 und CFTR. Der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchange-Regulating-Faktor (NHERF) kommt hauptsächlich an der apikalen Membran des proximalen Tubulus vor, wo er regulatorisch auf den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher wirkt. NHERF wird auch im kortikalem Sammelrohr exprimiert. Dort wurde gezeigt, dass er mit ROMK kolokalisiert (70).

MAP17 (Klon 4) ist in hoher Anzahl im proximalen Tubulus des Nephron zu finden. Es spielt bei der Zellproliferation eine Rolle und wird in Tumorzellgewebe exprimiert. MAP17 wird hauptsächlich in der Zellmembran gefunden und findet sich oft in der Nähe von Ionenkanälen. MAP17 interagiert mit einem PDZ-Domän tragendem Protein namens PDZK1 (71).

Proteine, die in die Organisation und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert sind, Interaktionsdomänen tragen und möglicherweise regulatorisch auf ROMK wirken (Gruppen 1, 2 und 3)

Hef1 (Klon 22) gehört zur Familie der Multidomänen-Docking-Proteine, die eine zentrale Rolle bei der auf Tyrosinkinase basierenden Signaltransduktion einnehmen. Der H.S. enhancer filamentation 1 (Hef1) wird u.a. von der Abl-Tyrosinkinase phosphoryliert. Hef1 besitzt eine SH3-Domäne und ist damit an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Hef1 ist ein wichtiges Element, das extrazelluläre Signalwege mit der Regulation des Zytoskeletts verknüpft (60, 61, 62).

Shank3a (Klon 3) gehört einer Familie von Scaffold-Proteinen mit bisher drei Mitgliedern an, Shank 1-3, die an zytoplasmatische und Membranproteine, wie z.B. GKAP, Homer und SAPAP binden. Shank3a besitzt mehrere Interaktionsstellen, darunter auch eine PDZ-Domäne und eine SH3-Domäne. Shank3 wird hauptsächlich im Herz, aber auch im Gehirn und in der Milz gefunden. Eine wichtige Aufgabe besteht in der Regulation des Zytoskeletts und in der Interaktion mit Strukturproteinen und deren Funktionssteuerung. So ist es u.a. ein postsynaptisches Protein, das einen Teil des mit dem NMDA-Rezeptor assoziierten PSD95-Komplexes darstellt (63, 64, 65).

POSH (Klon 66) hat vier SH3-Domänen und interagiert mit der GTP-Form von Rac. Expression des Proteins „Plenty of SH3s“ (POSH) führt zu Aktivierung des JNK-Weges und der nukleären Translokation von NF $\kappa$ B. Es wird vermutet, das POSH als Scaffold-Protein dient und durch den Rac-induzierten Signaltransduktionsweg zur Transkription verschiedener Gene führt. So steuert POSH möglicherweise durch die Transkription von Genen die Aktinfilamentsynthese, deren Polymerisation und damit die Regulation und Organisation des Zytoskeletts (66).

Arg/AblBP2 (Klone 138, 139) bindet an ein Mitglied der Abelson Familie der Tyrosinkinasen. Das Arg/Abl-binding protein, (ArgBP2), hat drei c-terminale SH3-Domänen, mehrere prolinreiche Regionen und verschiedene potentielle Phosphorylierungsseiten. Es kommt in den meisten menschlichen Geweben vor und dient wahrscheinlich als Adaptorprotein bei der Formation von Signal Komplexen in Stress-Fasern. Außerdem



verknüpft es die Abelson Familie der Tyrosinkinase mit dem Aktin-Zytoskelett, das es reguliert (69).

#### Proteine, die Kanäle darstellen (Gruppe 4)

Aquaporin1 (Klon 173) ist ein intrinsisches Membranprotein, das als wasserselektiver Kanal in der Plasmamembran vieler Zellen fungiert, u. a. in Auge, Hirn, Lunge. Aquaporin1 ist verantwortlich für die Reabsorption von Wasser im proximalen Tubulus im absteigenden Teil der Henle-Schleife in der Niere (72).

Antiquitin1 (Klone 10, 19) wurde aus der Cochlea des Menschen durch die „Yeast Two-Hybrid“-Methode isoliert. Es wird aber auch in hoher Masse in der Niere exprimiert und spielt bei Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Turgordruckes. Es wird vermutet, dass es sich bei Antiquitin selbst um einen Kanal handelt (73).

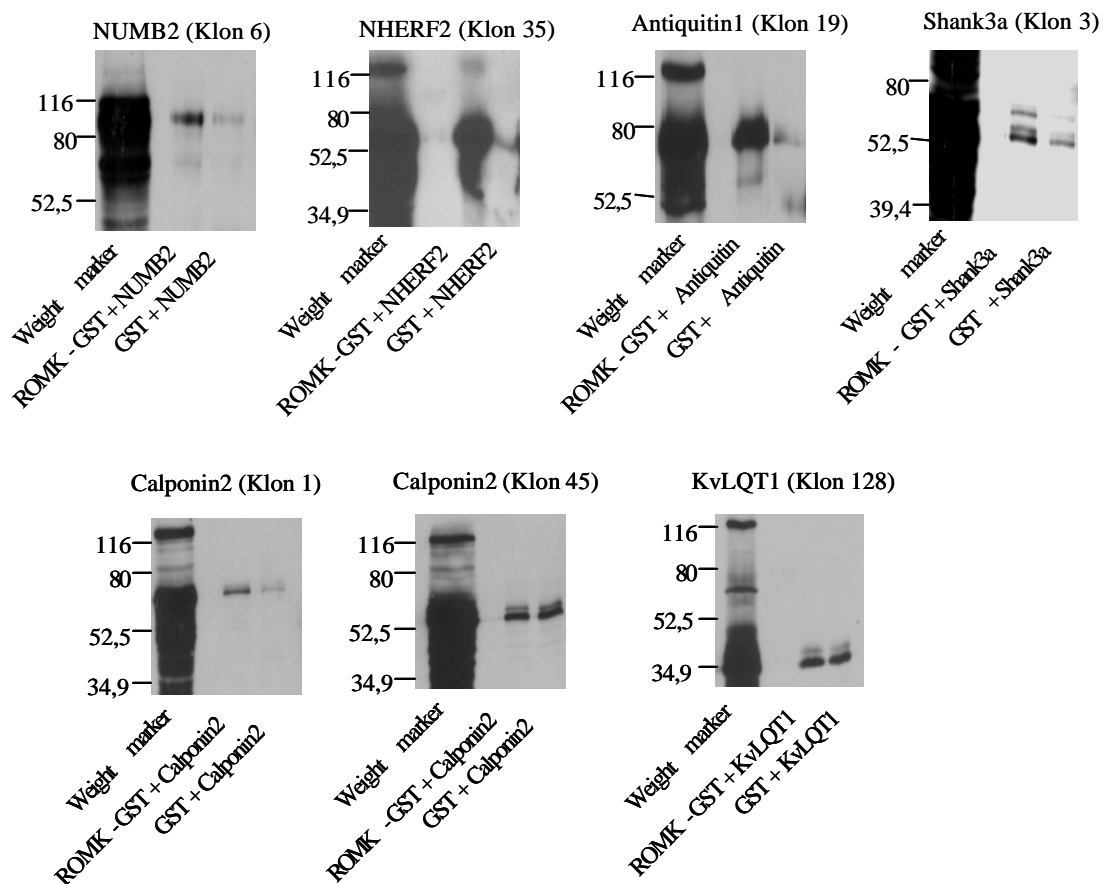
KvLQT1 (Klon 128) ist ein spannungsabhängiger Kaliumkanal, formt Heteromere und assoziiert mit der kleinen Untereinheit von KCNE zu dem verzögert rektifizierenden Kaliumkanal des Herzens (74, 75).

### **3.3. Ergebnisse der ROMK-GST-Pull-Down-Experimente**

Die GST-Pulldown-Experimente wurden mehrfach durchgeführt. Wie in Kapitel 2.7.3. beschrieben, wurden die zu testenden Proteine X bzw. deren Fragmente aus den Hefezellen direkt isoliert. Zur Überprüfung, ob das Fusionsprotein ROMK-GST bzw. GST ausreichend exprimiert worden sind, wurde eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-GST bzw. einem Anti-ROMK-Antikörper durchgeführt. (s. Abbildung 10.). Hierbei war ein Konzentrationsunterschied zwischen den Fusionsproteinen GST-ROMK und GST festzustellen. Daher wurde die Konzentration des GST-ROMK-Proteins variiert. Außer GST als Negativ-Kontrolle diente bei weiteren Versuchen das Protein NHERF2 als Positiv-Kontrolle. Es ist bekannt, dass NHERF2 an ROMK bindet und auch mit ihm kolo-kalisiert. Die weiteren Ergebnisse der Pull-Down-Experimente variierten sehr stark. So konnte eine Interaktion von ROMK und Protein X, außer bei NHERF2, nur noch bei

den Proteinen Antiquitin1 (Klon 19), Shank3a (Klon 3), NHERF2 (Klon 15), NUMB2 (Klon 6) und Calponin2 (Klon 1) in den Western Blots gezeigt werden. Auffallend war aber das Ergebnis, dass Calponin2, in einem anderen Hefeklon exprimiert, nicht nur an GST-ROMK band (Klon 1), sondern auch mit der Negativkontrolle GST interagierte (Klon 45). Dieses Phänomen der „Doppelbindung“ zeigten auch andere Proteine, wie POSH, Hef1, Aquaporin1, ArgBP2, Map17, Acidic Calponin, Dia2 und KvLQT1 (s. Abbildung 13., Western Blot, Klon 128). Es ist daher nicht möglich, eine Interaktion zwischen diesen Proteinen und ROMK durch GST-Pull-Down-Experimente zu bestätigen. Auch ist nicht auszuschließen, dass diese aussichtsreichen Proteine nicht doch nur an ROMK binden. Technische Probleme haben eventuell eine Interaktion zwischen den Proteinen verhindert, (s. 4.2.1.).

**Abbildung 13. Western Blot-Analyse der Pull-Down-Experimente.** Auf jedem Western Blot ist ein Höhenmarker (Angaben in kD) und die Banden von ROMK-GST + Protein X zu sehen. Eine dunkle Bande zeigt die Interaktion der Proteine.



### **3.4. Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien in COS-7-Zellen**

Für die Versuche der Immunfluoreszenz wurden die cDNA von POSH, NUMB2, Dia2, HEF1, ArgBP2 und Shank3a mit ROMK in COS-7-Zellen kotransfiziert. Diese Klone wurden von kollaborierenden Laboratorien bezogen, (s. 2.9.1.), und waren jeweils in Säuger-Expressions-Vektoren enthalten. Dazu waren entweder auch Antikörper gegen das spezifische Protein mitgeliefert worden, oder der Vektor mit einem Myctac oder HA-Tag-Antigen versehen. Als zweiter Antikörper diente entweder ein Anti-Maus oder, für ROMK, ein Anti-Hase-Antikörper. Die Transfektionseffizienz war im unteren Bereich, wobei mit verschiedenen Lipid/DNA-Konzentrationen im Verhältnis 6:1 und 7:1 gearbeitet wurde. Insgesamt waren die Kotransfektion mit anschließender Immunfluoreszenz nicht sehr aussagekräftig. Es konnte keine eindeutige Kolokalisation mit den Proteinen und ROMK festgestellt werden. NUMB2 wurde auf der Zelloberfläche detektiert, ohne mit ROMK zu kolokalisieren. Auch bei Dia2 und ROMK war keine Kolokalisation erkennbar. Das gleiche gilt auch für POSH. Mit der Darstellung des Proteins Hef1 gab es Schwierigkeiten, da der Antikörper, Anti-Hase, gleichzeitig ROMK, sowie HEF1 detektierte. Bei den Proteinen ArgBP2 und Shank3a gab es hoffnungsvollere Ergebnisse. Normalerweise zeigt ROMK an der Zelloberfläche und zum Teil auch im Zellinneren ein glattes Muster. Bei der Koexprimierung mit Shank3a bildeten sich aber Klumpen, das glatte Muster von ROMK war nicht mehr zu erkennen. Auch ArgBP2 änderte das Muster von ROMK. Der Kanal wurde viel weniger auf der Zelloberfläche von dem Antikörper detektiert. Beide Proteine müssen also einen Effekt auf ROMK haben. Trotzdem konnte bei beiden nicht auf eine direkte Kolokalisation geschlossen werden.

## **4.0. Diskussion**

### **4.1. Drei „Yeast Two Hybrid“-Screens - 174 mögliche Interaktionspartner**

Die „Yeast-Two-Hybrid“-Methode (80, 81) ist eine sehr sensitive und aussagekräftige Technik zur Feststellung von Protein-Protein-Interaktionen in vivo. So konnte mit dem „Yeast-Two-Hybrid“-Screen die Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen Teil von ROMK und vielen anderen Proteinen in Hefezellen getestet werden. Es wurden drei „Yeast-Two-Hybrid“-Screens durchgeführt; dabei wurden eine Million Klone aus einer cDNA Bibliothek der Niere auf eine Interaktion mit ROMK hin überprüft. Nach Eliminierung falsch-positiver Klone wurden 174 verschiedene Proteine identifiziert und deren DNA sequenziert.

Literaturrecherchen wurden für alle Proteine durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Mehrzahl der Proteine Transkriptionsfaktoren, mitochondriale Proteine und hypothetische, weiter noch nicht charakterisierte Proteine waren. Transkriptionsfaktoren und Proteine des Zell-Zyklus waren für die nähere Charakterisierung unerheblich. Sie stellen in der Regel falsch-positive Klone dar, da sie in der Lage sind, die Transkription ohne eine Interaktion zu starten. Auch mitochondriale Proteine, die in der Mehrzahl der „Yeast-Two-Hybrid“-Experimente als Interaktionspartner für Köderproteine gefunden werden, sind falsch-positive Ergebnisse. Sie haben keinen Bezug zu einem an der apikalen Membran gelegenen Kaliumkanal. Eine weitere, größere Anzahl von Proteinen konnte aufgrund ihrer Eigenschaften und Lokalisation (siehe Abschnitt 3.1.) ebenfalls als uninteressant für die weiteren Experimente erklärt werden, da sie keinen Einfluss auf ROMK und dessen Regulierung haben. Auch wurde davon Abstand genommen, hypothetische, noch nicht weiter charakterisierte Proteine näher zu untersuchen. So wurden 17 Proteine als mögliche Interaktionspartner ausgewählt, von denen man aus den Literaturstudien wusste, dass sie Regulation und Funktion von Membranproteinen beeinflussen und daher auch auf ROMK wirken könnten. Zu dieser Auswahl gehören Proteine, die den Aufbau des Aktin-Zytoskeletts steuern, Interaktionsdomänen aufweisen, regulatorische Eigenschaften besitzen oder Proteinkinase-assoziiert sind und zwei Proteine, die selbst Kanäle darstellen. Da nur 1/10 der cDNA-Nierenbibliothek auf eine Interaktion mit ROMK überprüft wurde, ist anzunehmen, dass es weitere Interaktionsproteine gibt, die in unserem Experiment aber nicht gefunden wurden.

#### 4.1.1. Reduzierung der Proteine auf 13 aussichtsreiche Interaktionspartner

Obwohl ROMK an seinem C-terminalen Ende ein PDZ-ähnliches Motiv aufweist, haben nur zwei PDZ-Domänen tragende Proteine, NHERF2 und Shank3a, an ROMK gebunden. Es drängt sich nun die Frage auf, inwiefern die letzten drei Aminosäuren des C-terminalen Endes ein PDZ-Motiv darstellen. Diese Frage ist mit den durchgeführten Experimenten nicht eindeutig zu beantworten. Einerseits fehlen, wie oben erwähnt, zur kompletten Abdeckung der cDNA-Bibliothek noch 9/10 der darin enthaltenen Proteine, die selbstverständlich auch PDZ-Domänen besitzen könnten. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass ROMK kein PDZ-Motiv aufweist, und die Proteine NHERF2 und Shank3a nicht an diesen Abschnitt des C-Terminus banden. Zur Klärung dieser Frage müssten mit Hilfe der PCR-Technik die letzten drei Aminosäuren, und damit das mögliche PDZ-Motiv entfernt werden, um eine Bindung Shank3a und NHERF2 an diesen Teil überprüfen zu können. Dennoch ist anzunehmen, dass auch ROMK, wie viele andere Membranproteine, ein PDZ-Motiv besitzt.

Die weitaus größere Anzahl der mit ROMK interagierenden Proteine besitzen SH3-Domänen. SH3-Domänen binden an prolinreiche Regionen von Interaktionsproteinen. ROMK aber weist in seinem 200 Aminosäuren langen C-terminalen Abschnitt nur siebenmal die Aminosäure Prolin auf, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft liegen. Es ist zu vermuten, dass ROMK sich so faltet, dass sich diese Aminosäuren in stereochemischer Nachbarschaft befinden und somit eine Bindung von SH3-Domänen ermöglichen. Auch bestand die Möglichkeit, dass der Bindungspartner dieser Proteine nicht ROMK war, sondern nur die BD-Domäne des Fusionsproteins ROMK-Gal4BD. Diese Hypothese wurde mit der Transformation der möglichen Interaktionsproteine im pACT2-Vektor und dem BD-Domän-tragenden pAS2-1-Plasmid überprüft und ausgeschlossen, (s. 3.1.3.). Bei diesem Kontrollexperiment zeigten nur Hefezellen, die mit der cDNA von H.S. Actin Beta (Klone 96 und 158) transformiert wurden, auf Selektionsplatten Wachstum und damit eine nicht-spezifische Aktivierung.

Bei Durchführung eines direkten „Yeast-Two-Hybrid“-Versuchs mit ROMK und Protein X zeigten nur die Transformanten von ROMK und WDR1 (Klon 105), sowie ROMK und TRIO (Klon 168) auf Selektionsplatten kein Wachstum. Es ist anzunehmen, dass hier keine Interaktion stattgefunden hat, obwohl sich in dem Library-Screen eine Interaktion in Form von Hefewachstum zeigte. Es ist denkbar, dass die Interaktion in den

Library-Screens durch eine Hefezellmutation möglich war, so dass die Transkription auch ohne Aktivierung durch eine Partnerbindung startete. Des Weiteren können auch eigene Hefepoteine eine „Brücke“ zwischen WDR bzw. TRIO mit ROMK gebildet und somit die Transkription aktiviert haben, obwohl keine direkte Bindung der Proteine an den Kaliumkanal erfolgte, (siehe 4.1.2.).

Wie schon unter 3.1.3. erwähnt, zeigte sich bei der Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse, dass die cDNA der Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) Kinase (Klone 46 und 58) außerhalb des für die Kinase translatierenden Teiles liegt, und damit nicht die Kinase das Protein war, das mit ROMK interagiert. Die Tatsache, dass diese Kinase ein falsch-positiver Klon ist, ist zu bedauern, war doch ihre Interaktion mit ROMK sehr Erfolg versprechend. Wie in der Einleitung schon erwähnt, wird die Aktivität von ROMK über Kinasen, wie PKA, PKC und PTK reguliert. Von dem Second Messenger IP<sub>3</sub> weiß man, dass er Proteinkinasen aktiviert und damit Phosphorylierungen von Proteinen sowie die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> beeinflusst und steuert. Daher hätte diese Kinase als Interaktionspartner mit ROMK von großer Bedeutung sein können. Es reduzierten sich die aussichtsreichen Proteine von 17 auf 13 Klone.

#### **4.1.2. Beurteilung der Ergebnisse der „Yeast-Two-Hybrid“-Experimente**

In Punkt 1.5.5. wurde auf zwei mögliche Theorien der Regulationssteuerung ROMKs in der Membran und der möglichen Interaktion mit anderen Proteinen eingegangen (83). Die Ergebnisse der „Yeast-Two-Hybrid“-Screen Methode zeigen, dass der zytoplasmatische Teil des ATP-abhängigen Kaliumkanals der Niere ROMK an Protein-Protein-Interaktionen, u.a. durch PDZ- und SH3-Domänen beteiligt ist.

Dabei banden sowohl Proteine des Zytoskeletts, wie Shank3a (63) oder Calponin2 (85), als auch Proteinkinase-assoziierte Proteine, wie Hef1 (62) und ArgBP2 (69). Die Erkenntnis, dass Proteine an ROMK binden, die das Aktin-Zytoskelett mit Tyrosinkinasen verknüpfen, lässt hoffen, dass über diese Interaktionen die Aktivität und Zielsteuerung des Kanals reguliert werden. Wie neue Erkenntnisse in der ROMK-Forschung zeigen, (91, 92, 93) nimmt die Bedeutung der Tyrosinkinasen bei der Regulierung und Funktionssteuerung von Kanälen zu. Unsere Experimente und Ergebnisse lassen es allerdings nicht zu, die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen aufzudecken.

Der „Yeast-Two-Hybrid“ ist eine Methode zur Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen in vivo. Hefezellen stellen einen lebenden, dynamischen Organismus dar, der sich Veränderungen unterzieht. So ist es möglich, dass auch bei den als interessant eingestuft und auf Autoaktivierung überprüften Klonen falsch-positive Bindungen erfolgten. Dynamische Prozesse und Veränderungen der Hefezelle können Ursachen für solche Bindungen sein. Mögliche falsch-positive Ergebnisse sollen anhand der Proteine Map17 und Aquaporin1 (AQ1) besprochen werden.

Die Bindung dieser beiden Proteine an ROMK ist spannend, lässt aber Zweifel über eine physiologische Bedeutung aufkommen und hinterfragt die Interaktionen. AQ1 wird im proximalen Tubulus exprimiert und kann damit nicht mit ROMK kolokalisieren (72). Es besteht die Möglichkeit, dass ein in der Niere exprimiertes, aber noch nicht weiter charakterisiertes Protein, Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz mit AQ1 zeigt und daher nicht der eigentliche Interaktionspartner, sondern AQ1 in der Basen-Sequenz-Analyse gefunden wurde. Eine Bindung von Aquaporin2 (AQ2) wäre in unserem Experiment wünschenswert gewesen, da vermutet wird, dass AQ2 mit ROMK in Vesikeln kolokalisiert und diese Proteine gemeinsam in die Membran inseriert werden. Daher ist anzunehmen, dass AQ1 nicht an ROMK bindet.

Auch Map17 wird in hohem Maße im proximalen Tubulus exprimiert, weist ein PDZ-Motiv auf und bindet an PDZK1, ein Protein mit zwei PDZ-Domänen (71). Normalerweise interagieren zwei PDZ-Motiv aufweisende Membranproteine wie ROMK und Map17 nicht direkt miteinander. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die Interaktion von ROMK und Map17 bei diesen Versuchen durch in der Hefezelle exprimierte Proteine ermöglicht wurde; also Proteinen, die, ähnlich PDZK1, über Interaktionsdomänen verfügen. Diese „Brückenproteine“ haben daher möglicherweise eine Interaktion vorgetäuscht. Neben der Theorie der Brückenproteine sowie der Ähnlichkeit von Proteinen in der Basen-Sequenzanalyse besteht die Möglichkeit, dass Hefezellen mutieren können und Ergebnisse im Rahmen der Autoaktivierung durch Starten der Transkription verfälschen. Diese angeführten, die Interaktion kritisch hinterfragenden Möglichkeiten, gelten selbstverständlich für alle ausgewählten Interaktionspartner. Die Klärung der Ergebnisse schlägt die Brücke zu den GST-ROMK-Pull-Down-Experimenten und den Immunfluoreszenzstudien, die weitere Techniken zur Charakterisierung von Interaktionen oder Kolokalisationen von Proteinen darstellen.

## **4.2. Der zytoplasmatische Teil von ROMK bindet an NHERF2, Calponin2, Shank3a, Antiquitin1 und NUMB2 in den GST-ROMK-Pull-Down-Experimenten**

Das GST-Pulldown-Experiment (82) ist ebenfalls eine sehr sensitive, dafür aber schnellere und einfacher durchführbare Technik als die „Yeast-Two-Hybrid“-Methode.

Um Umklonierungen und den damit verbundenen Zeitaufwand zu umgehen, wurden die Testproteine aus der Hefezelle isoliert. Dadurch konnte GST-ROMK mit dem jeweiligen aus der Hefezelle isolierten Fusionsprotein Protein-X-AD inkubiert und eine Interaktion mit ROMK direkt getestet werden.

Die Ergebnisse der Versuche fielen, wie unter 3.3. erwähnt, sehr unterschiedlich aus.

Nur bei den Proteinen NHERF2, Antiquitin1, Shank3a, Calponin2 (Klon 1) und NUMB2 konnte eine Interaktion mit GST-ROMK reproduziert werden. Das lässt folgern, dass diese Proteine auch an ROMK binden.

Bei den anderen Klonen, wie in Abbildung 13. bei Klon 128, KvLQT1 stellvertretend ersichtlich, zeigten sich Banden bei GST-ROMK und bei der Negativkontrolle, GST. Diese „Doppelbindung“ bedeutet, dass Protein X zwar wie erhofft an ROMK-GST band, aber auch mit der Negativkontrolle, GST interagierte. Daher kann man aus diesen Ergebnissen keine Rückschlüsse auf eine Interaktion ziehen.

Interessanterweise zeigte Calponin2, in unterschiedlichen Hefeklonen expimiert, (Klone 1 und 45) unterschiedliche Bindungseigenschaften. Während bei Klon 1 nur bei ROMK-GST eine Bande und daher eine Interaktion festzustellen war, zeigte dagegen Klon 45 sowohl bei GST-ROMK als auch bei GST eine Bindung in Form einer Bandenmarkierung. Calponin2 ist daher auf eine Interaktion hin mit ROMK schwer einzuordnen, da zweideutige Ergebnisse vorliegen. Es ist möglich, dass technische Schwierigkeiten zu diesen Resultaten führten. Im nächsten Abschnitt werden mögliche Gründe für diese „Doppelbindung“ diskutiert.

### **4.2.1. Beurteilung der Ergebnisse der GST-ROMK-Pulldown-Experimente**

Im Grunde ergaben sich bei den Versuchen zwei Standardergebnisse:

- 1) eine Bindung an GST-ROMK und damit die Bestätigung der Interaktion wie sie auch im „Yeast-Two-Hybrid-Versuch“ stattfand.
- 2) eine Doppelbindung an GST-ROMK und an die Negativkontrolle GST.



Das GST-Pulldown-Experiment ist zwar schnell und einfach durchführbar, birgt aber potentielle Fehlerquellen, die zu den unter Punkt 2) aufgeführten Resultaten führten. Zur Durchführung der Experimente sind akkurate Mengenverhältnisse zwischen Testprotein (Protein X) und Köderprotein (GST-ROMK) von großer Bedeutung, die in diesen Experimenten nicht immer optimal waren. Aufgrund niedriger Proteinkonzentrationen wurde in einigen Experimenten darauf verzichtet die Konzentrationen genau abzugleichen. Daher wurden die Experimente wie im Abschnitt 2.7.4. beschrieben durchgeführt.

Durch die direkte Isolierung der Testproteine aus den Hefezellen variierten deren Konzentrationen. Auch waren unterschiedliche Konzentrationen von GST-ROMK und GST bei der Proteinexprimierung in Bakterienzellen erzielt worden (s. Abbildung 10.). So können zu hohe Konzentration von Protein X und damit ein Überschuss an Testprotein, Bindungen an die Agarosekügelchen oder an GST (82) ermöglicht und zu einer „Doppelbindung“ geführt haben. Auch ein zu hoher Anteil an GST-Protein im Versuchsaufbau und dessen „klebrige“ Eigenschaften können Artefaktbildungen und die Bindung von Protein X an GST erklären (82). Ebenfalls ist es denkbar, dass die Waschschritte mit Perlen-Binde-Puffer bei einigen Klonen nicht ausreichend waren, um nicht gebundenes Protein X zu entfernen. So konnte der Anti-HA-Tag-Antikörper freies Protein X detektieren und ermöglichte nicht nur bei GST-ROMK eine Bande, sondern auch bei GST.

Es ist aber auch denkbar, dass bei Klonen, die eine Doppelbindung zeigten, zu wenig GST-ROMK und Protein X im Versuchsaufbau vorhanden waren, um überhaupt eine Interaktion zu ermöglichen. Die Banden in der Western Blot-Analyse wären dann durch oben genannte Gründe bedingt. Ausreichende Konzentrationen an Köder- und Testprotein hätten womöglich zu einer signifikanteren Bande bei GST-ROMK im Vergleich zu GST geführt. Eine mögliche Ursache liegt in der fehlerhaften oder mangelnden Bildung des GST-ROMK-Fusionsprotein in dem Bakterienstamm CL21, die eine Detektierung durch das Testprotein erschwert oder unmöglich machte. Es hat eventuell auch eine Degradierung des GST-ROMK-Fusionsproteins stattgefunden. Dies hat zur Folge, dass die zur Bindung an die Agarosekügelchen notwendigen Bindungsstellen möglicherweise verloren gingen, und damit kein Protein oder nur ein Teil an die Agaroseperlen band. Dadurch hätte zu wenig oder kein immobilisiertes Köderprotein zur Interaktionsprüfung

zur Verfügung gestanden. Da Hefezellen sehr aktive Proteasen bilden, ist auch denkbar, dass bei der Isolierung der Testproteine wesentliche Abschnitte verdaut wurden, und damit für eine Interaktion mit GST-ROMK nicht mehr vorhanden waren.

Aufgrund dieser, die Interaktion der Proteine verhindernden Möglichkeiten und die oben beschriebenen Ursachen der Doppelbindung, sind die Klone, die nicht wie NHERF2, Antiquitin1, Shank3a, Calponin2 (Klon 1) und NUMB2 eine eindeutige Interaktion mit ROMK aufweisen, nicht zu beurteilen. Der Übergang zu den Immunfluoreszenzstudien zur weiteren Abklärung der Ergebnisse ist damit gegeben.

### **4.3. Shank 3a und ArgBP2 kolokalisieren mit ROMK und verändern sein Muster**

Auch die Immunfluoreszenzstudien ergaben keine klare Aussage über eine Interaktion der Testproteine mit ROMK. Die erzielten Transfektionseffizienzen waren sehr niedrig, und daher exprimierten sehr wenige Zellen beide Proteine. Die einzigen Proteine, bei denen sich das Lagerungsmuster ROMKs veränderte, waren ArgBP2 und Shank3a. Die Proteine POSH, NUMB2, Dia2 und Hef1 zeigten keine eindeutige Kolokalisation. Die cDNA der anderen Testproteine X war zu dem Zeitpunkt der Versuche nicht verfügbar. Daher konnten die Kolokalisationstudien nur an den oben genannten Proteinen durchgeführt werden.

#### **4.3.1. Beurteilung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien**

Die einzigen Proteine, bei denen sich das Lagerungsmuster von ROMK veränderte, obwohl keine genaue Kolokalisation zu erkennen war, waren ArgBP2 und Shank3a. Normalerweise zeigt ROMK bei Immunfluoreszenzstudien ein glattes Muster. Nach Koftransfektion von ROMK mit Shank3a in COS-7-Zellen, wurde ROMK weniger auf der Zelloberfläche von dem Antikörper detektiert. Es bildeten sich Klumpen. Von Shank3a weiß man, dass es u. a. das Lagermuster des G-Protein-verknüpfenden Rezeptor CL1 in Immunfluoreszenzstudien (88) verändert. Da Shank3a an der Organisation des Zytoskelett beteiligt ist, bzw. mit Tyrosinkinasen assoziiert, wäre es möglich, dass die Klumpenbildung ein Indiz dafür ist, dass Shank3a durch Endo- bzw. Exozytoseprozesse regulatorisch auf ROMK wirkt. Womöglich stellen die Klumpen subapikale Vesikel dar, in

denen die Kanäle gespeichert sind. Eine Involvierung des Aktin-Zytoskeletts bei der Klumpenbildung ist auch denkbar. Shank3a gehört nach Bindung an ROMK in den „Yeast-Two-Hybrid“-Versuchen, der Interaktion in den GST-Pull-Down-Experimenten und dem Einfluss auf das Lagerungsmuster von ROMK in den Immunfluoreszenzstudien zu den aussichtsreichsten Interaktionspartnern. Bei ArgBP2 veränderte sich das Muster von ROMK; aber weniger signifikant. Es lässt sich vermuten, dass Shank3a und ArgBP2 Einfluss auf die Verteilung von ROMK haben, und sie seine Lokalisation und Funktion mitbestimmen.

Über die Proteine Calponin2 und Antiquitin1, die auch in den GST-Pull-Down-Experimenten mit ROMK interagierten, sind keine Aussagen zu treffen, da ihre cDNA für diese Studien nicht zur Verfügung stand. Weitere Gedankenspiele zur möglichen Einflussnahme der Proteine auf ROMK werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### **4.4. Diskussion der möglichen Interaktionsproteine- Hypothesen und Gedankenspiele**

Die durchgeführten Experimente und Versuchstechniken zur Abklärung einer Interaktion von ROMK mit Testproteinen zeigten, dass nur Shank3a, Calponin2, NHERF2, Antiquitin1, NUMB2, ArgBP2 von den 13 als interessant eingestuften Interaktionspartnern eine reproduzierbare Bindung zeigten.

Daher werden nur diese Proteine ausführlich in diesem Abschnitt diskutiert.

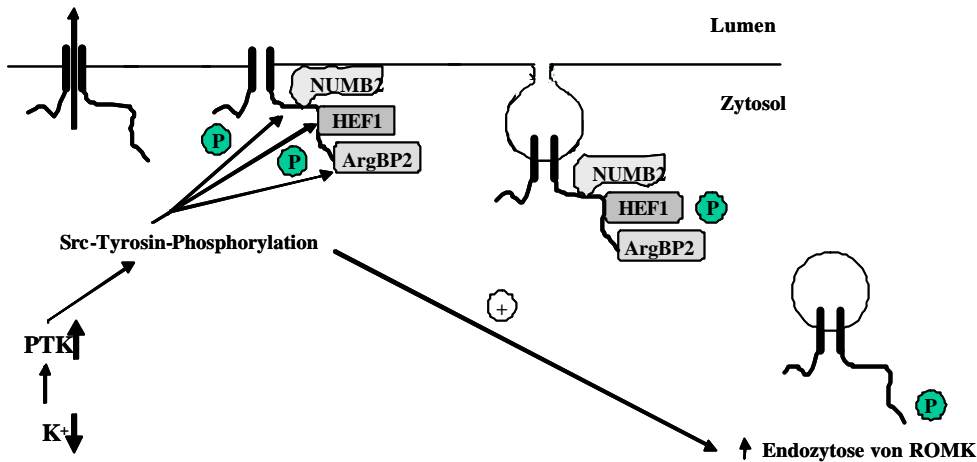
1) **NHERF2** ist PDZ-Domän tragendes Protein. Studien zeigten, dass NHERF2 an ROMK bindet und mit ihm im CCD kolokalisiert (70). Auch ist bekannt, dass NHERF2 mit einer seiner zwei PDZ-Domänen an CFTR bindet, welcher die Aktivität ROMKs beeinflusst (94). Hier ist es möglich, dass NHERF2 ROMK und CFTR über seine PDZ-Domänen verknüpft, bzw. ROMK Proteine zu Dimeren verankert (95). NHERF2 ist mit Tyrosinkinasen assoziiert und spielt eine wesentliche Rolle bei dem Recyclen von Rezeptoren in Endosomen oder dem Sorting in Endosomen (94). Daher ist es möglich, dass NHERF2 eine wesentliche Bedeutung bei der von Tyrosinkinasen assoziierten Regulationsschritten in Verbindung mit ROMK einnimmt.

2) **NUMB2** ist ebenfalls endozytotisch aktiv. NUMB ist membran-assoziiert und wird in den meisten Geweben exprimiert (67). Die PTB-Domäne (phosphotyrosine binding domain) von NUMB interagiert mit diversen Proteinen, darunter bindet sie Rezeptoren wie Notch. Durch eine prolinreiche Region interagiert NUMB mit Rezeptor-Tyrosinkinasen und Src-Kinasen (68). Da NUMB mit Organellen des Endozytoseapparat interagiert, des Weiteren mit Tyrosinkinasen assoziiert, spricht vieles dafür, dass es an der durch Tyrosinkinase bedingten Steuerung ROMKs wesentlich beteiligt ist (68, 90), (s. Abbildung 14.). Interessant ist auch, dass es nicht nur ein endozytotisches Protein ist, sondern auch mit internalisierenden Rezeptoren mitverkehrt (90). Dies wäre auch bei der Internalisierung ROMKs nach Stimulierung durch PTK denkbar.

3) **ArgBP2 (+Hef1)** (61, 69) sind mit Tyrosinkinasen, wie FAK und Abl assoziiert. So wird HEF1 u.a. durch die nicht rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase, cSrc, phosphoryliert (62). Wie Studien zeigten, wird cSrc in der Nierenrinde exprimiert. Die Expression ist abhängig von der Kaliumaufnahme. Eine kaliumreiche Ernährung erniedrigt die Proteinkonzentration, eine kaliumarme Diät, steigert die Expression der Kinase (91). Daher korreliert die Aktivität von cSrc-Tyrosinkinasen mit der Aktivität von Kaliumkanälen, auch mit dem ATP-abhängigen Kanal ROMK (92). Beide Proteine weisen keine PDZ-Domäne auf, verfügen dafür aber über eine SH3-Domäne und könnten so an eine prolinreiche Region ROMKs binden (62, 69). HEF1 und ArgBP2 könnten ein Verknüpfungselement zwischen ROMK, dem Aktinzytoskelet und Tyrosinkinasen darstellen (69) und dadurch Endo- bzw. Exozytoseschritte in Zusammenhang mit dem Zytoskelett steuern, (s. Abbildung 14. und 15.). Veränderungen des Lagemusters von ROMK in den Immunfluoreszenzstudien lassen dies vermuten.

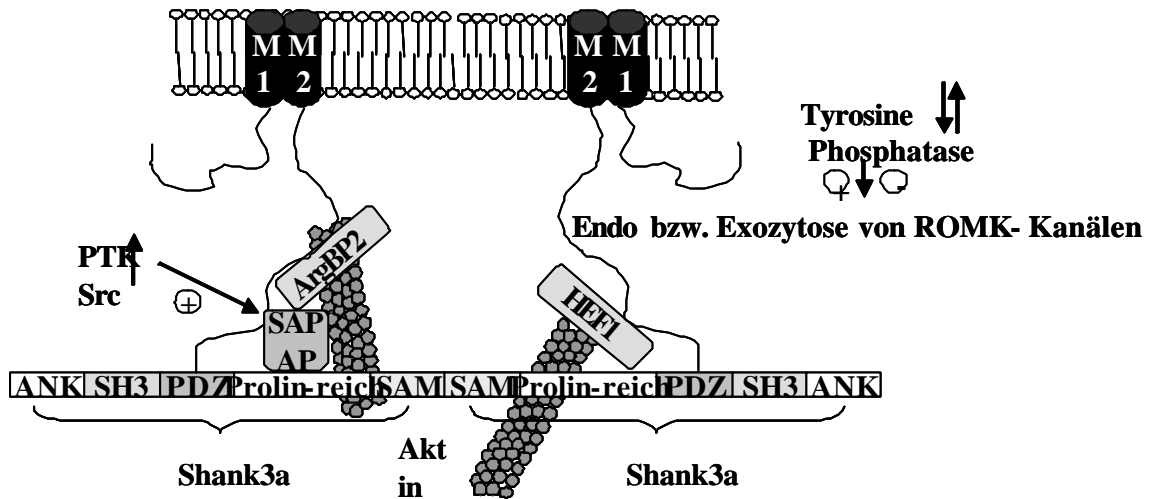
HEF1 ist zum Beispiel ein wichtiger Bestandteil bei der intrazellulären Signaltransduktion von  $\beta_1$ - bzw. Integrinrezeptor und dem Aktinzytoskelett (61). Es ist daher nicht auszuschließen, dass diese Proteine, u.a. durch cSrc modulierte Signalwege an der Membranregulation ROMKs eingreifen. Eine neuronale Form nArgBP2 bindet Proteine des PSD (post-synaptic-density) Komplexes (84) und damit möglicherweise auch das unter 4) beschriebene Protein Shank3a.

**Abbildung 14. Endozytosemodell von ROMK-Kanälen durch Interaktion mit den Proteinen NUMB2, ArgBP2 und Hef1 (hypothetisch).** Die Proteine NUMB2, ArgBP2 und Hef1 regulierende durch Phosphotyrosin-Kinase gesteuerte Endozytose die Aktivität der ROMK-Kanäle.



**4) Shank3a** gehört zur großen Familie der Shank-Proteine, die in Herz, Hirn, Milz und Niere isoliert werden konnten. Sie besitzen eine PDZ-Domäne und weitere Sequenzen für Protein-Protein-Interaktionen, wie eine prolinreiche Region und SAM-Domänen (64, 65). Es ist anzunehmen, dass Shank3a durch seine PDZ-Domäne mit dem zytoplasmatischen Teil von ROMK interagiert. Shank-Proteine können durch ihre SAM-Domäne Tyrosin-Phosphatase binden und auch Homomultimere bilden (65). Es ist vorstellbar, dass Shankmoleküle über ihre SAM-Domäne miteinander interagieren und, ähnlich wie bei den Glutamatrezeptoren, mehrere ROMK Kaliumkanäle verknüpfen (88, 89). Shank bindet auch an Aktin. So ist denkbar, dass, aktiviert durch Tyrosin-Phosphatasen, die Konformation des Shankproteins verändert wird und dadurch das Aktin-Zytoskelett Einfluss auf die Kanalaktivität von ROMK. So reguliert Shank womöglich die Aktivität des Kanals durch Endo, bzw. Exozytoseprozesse, indem in subapikalen Vesikeln gespeicherte Kanäle in die Membran inseriert werden (64, 65, 88, 89). Von Bedeutung könnte auch die gemeinsame Interaktion nArgBP2 und Shanks3a mit SAPAP sein. Womöglich bindet ArgBP2 an die prolinreiche Region Shanks und bildet daher ein Proteinnetzwerk, ähnlich die des PSD. Da HEF1 mit Abl assoziiert, das wiederum ArgBP2 bindet, wäre es auch ein Kandidat dieses Komplexes (s. Abbildung 15.).

**Abbildung 15. Interaktion von ROMK mit ArgBP2, Shank3a und Hef1 (hypothetisch).** Mögliche Verknüpfung und Steuerung von ROMK-Kanälen mit den Interaktionsproteinen ArgBP2, Shank3a und Hef1. Endo- und Exozytose der Kanäle werden durch Aktivierung von Tyrosinkinase, - und Phosphatase in Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett beeinflusst.



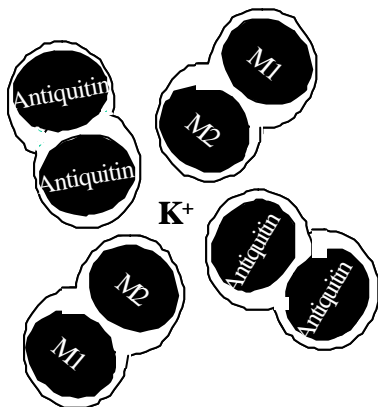
5) **Antiquitin1 (+KvLQT1).** Es wird angenommen, dass ROMK, ähnlich wie spannungsabhängige Kaliumkanäle, eine tetramere Struktur aufweist (83). Auch ist noch nicht geklärt, inwiefern ROMK (93) eine der poreformenden Untereinheiten des 30pS  $K^+$  Kanals, bzw. ein Teil des 70pS apikalgelegenen Kaliumkanals bildet. Zwei Proteine, KvLQT1 (74) und Antiquitin (73), die beide an den C-Terminus ROMKs banden, könnten dabei Partner von ROMK bei der Bildung dieser Kanäle sein. Antiquitin, ein in der Niere in hoher Konzentration exprimiertes Protein, nimmt in der Zellmembran Einfluss auf die Regulation von Elektrolyten und Wasser und spielt auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung des hydrostatischen Drucks (73). Die Aminosäuresequenz Antiquitins weist eine membran-domänähnliche Hydrophobie auf. So ist es möglich, dass Antiquitin womöglich selbst einen Kanal darstellt (73) und mit ROMK einen Kanal formt, (s. Abbildung 16.1.).

KvLQT1 ist ein spannungsabhängiger Kaliumkanal, der mit der kleinen Untereinheit von KCNE Heteromere und damit den langsam rektifizierenden Kaliumkanal des Herzens bildet (74), KvLQT1 wird auch wie ROMK durch Phospholipide, CFTR und Kinasen reguliert (75), in hoher Konzentration im Nierenmark exprimiert und ist auch wie

ROMK apikal im CCD lokalisiert (74). Ähnliche Regulationseigenschaften, die gleiche Lokalisation im Nephron und die Fähigkeit mit anderen Kanälen zu assoziieren und Tetramere zu formen, lässt vermuten, dass KvLQT1 an ROMK bindet und mit ihm einen Kanal bildet, (s. Abbildung 16.2.).

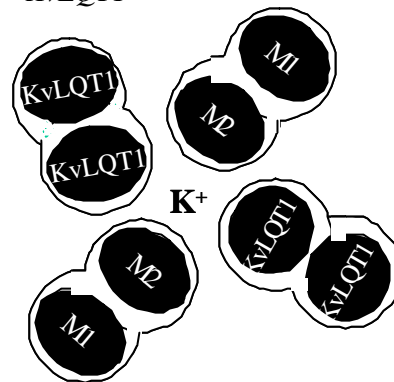
**Abbildung 16.1. Tetramere Struktur von ROMK mit Antiquitin1 (hypothetisch).**

*ROMK formt mit Antiquitin1 ein Tetramer und bildet einen neuen Kanal.*



**Abbildung 16.2. Tetramere Struktur von ROMK mit KvLQT1 (hypothetisch).**

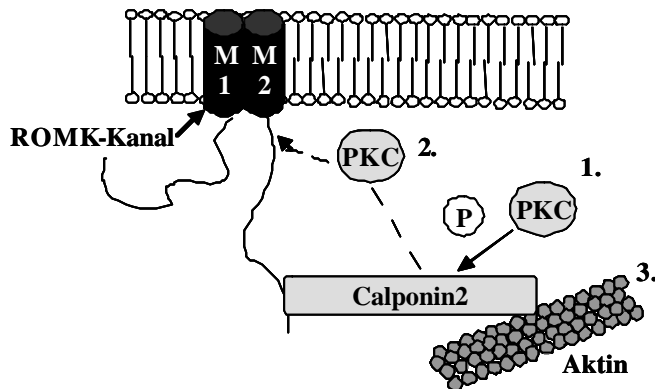
*Bildung eines Kaliumkanals durch Interaktion von ROMK und KvLQT1*



**6) Calponin2 (55) und Acidic Calponin (57)** sind in hoher Konzentration im Zytosol und an der Plasmamembran lokalisiert, sowie auch mit dem Aktin-Zytoskelett eng verbunden. Calponin2, interagiert mit ERK1 (extracellular receptor kinase) und anderen intrazellulär gelegenen Proteinen (87). Calponin2 wird durch Rho-Kinasen und PKC phosphoryliert (86). Es spielt womöglich eine wichtige Rolle in der Signalkaskade und der Informationsübermittlung von Rezeptoren zu kontraktilen Elementen (56, 87). Calponin2 hat die Fähigkeit in perimembranöses Gebiet zu migrieren und als Adapterprotein PKC und Map-Kinasen zur Plasmamembran zu transportieren (85). Möglicherweise stellt Calponin2 hier die Verknüpfung zwischen ROMK und PKC, von der man weiß, dass diese regulatorisch auf den Kanal wirkt, dar, (s. Abbildung 17.).

Denkbar ist auch, dass nach Stimulierung, Calponin2 als aktinbindendes Protein aktiv an der Endozytose ROMKs beteiligt ist, da es an der Fixierung des Zytoskeletts an der Plasmamembran involviert ist, und in Aktinbündel submembranös lokalisiert ist (85).

**Abbildung 17. Interaktion von ROMK mit Calponin2 (hypothetisch).** Calponin2 reguliert Protein-Kinase C (PKC) gesteuert die Aktivität des ATP-abhängigen Kaliumkanals ROMK.



#### 4.5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Experimente machen deutlich, dass ROMK mit seinem C-terminalen Ende an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Sowohl Proteine des Aktin-Zytoskeletts, sowie Proteine, die Tyrosinkinase-assoziieren, banden an ROMK. Daher ist davon auszugehen, dass beide in 1.5.5. beschriebenen Theorien der Regulationssteuerung vertretbar sind.

Da diese Experimente die Interaktionen zwar aufdecken, bzw. bestätigen konnten, aber keine Erkenntnisse über den Einfluss der Interaktionsproteine und die Regulationssteuerung auf ROMK offen legen, müssen Folgeversuche durchgeführt werden. So bringen elektrophysiologische Versuche, bei denen ROMK und das gewünschte Testprotein in *Xenopus laevis*-Oocyten koexprimiert werden, möglicherweise neue Erkenntnisse in der ROMK-Forschung. Durch Two-Elektroden-Voltage-Clamp- oder Patch-Clamp-Studien können Aktivitätsänderungen von ROMK durch Einflussnahme der isolierten Proteine direkt gemessen und näher charakterisiert werden. Speziell Shank3a scheint als Interaktionspartner von ROMK von Bedeutung zu sein. Nach positiven Ergebnissen in allen durchgeführten Versuchen werden elektrophysiologische Studien eine mögliche Regulation ROMKs durch Shank3a zeigen.

Sind regulatorisch wirkende Proteine in den Folgeversuchen identifiziert worden, wären die nächsten Schritte die genauen Interaktionsstellen der Proteine zu charakterisieren und auch den Regulationsmechanismus aufzudecken.



## **5.0. Zusammenfassung**

Protein-Protein-Interaktionen haben eine wesentliche Bedeutung bei der Regulierung verschiedenster Zellfunktionen. Sie spielen u.a. bei der Funktionssteuerung von Kanälen, Transportern und Ionenpumpen eine wesentliche Rolle. Ein PDZ-Motiv am C-terminalen Ende des ATP-abhängigen Kaliumkanals ROMK ließ mögliche Interaktionen mit zellulären und membran-assoziierten Proteinen erhoffen. Nach Durchführung dreier „Yeast-Two-Hybrid“-Screens zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von ROMK kamen 17, von ihrer Funktion schon bekannte, aussichtsreiche Proteine, in die enge Auswahl. Nach weiterer Charakterisierung und Autoaktivierungstests blieben 13 Proteine zur weiteren Abklärung übrig. GST-Pulldown-Experimente und Immunfluoreszenz brachten weitere Aufschlüsse und Erkenntnisse zur Interaktion zwischen ROMK und seinen Partnern. Folgende Erkenntnisse konnten aus den Versuchen gewonnen werden:

- \*) 174 positive Klone interagierten bei drei „Yeast-Two-Hybrid“-Screens mit dem zytoplasmatischen Teil von ROMK.
- \*) der zytoplasmatische Teil des ATP-abhängigen Kaliumkanals der Niere, ROMK, ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt.
- \*) Proteine des Aktin-Zytoskeletts und Tyrosinkinase-assoziierte Proteine binden an den zytoplasmatischen Teil von ROMK. Daher könnten beide in Punkt 1.5.4. erwähnten Theorien der Aktivitätsänderung ROMKs durch a) Stimulierung ruhender Kanäle bzw. b) Einbau von in Vesikel gespeicherten Kanälen in die Membran vertreten werden.
- \*) Shank3a, Calponin2, NHERF2, NUMB2 und Antiquitin1 binden an den C-terminalen Teil von ROMK in den GST-Pull-Down-Experimenten.
- \*) Shank3a und ArgBP2 verändern das Verteilungsmuster von ROMK in der Zelle.
- \*) Shank3a scheint für eine Interaktion mit ROMK am bedeutungsvollsten zu sein.

Hypothetische Modelle und Gedankenspiele über den möglichen Einfluss der Interaktionspartner auf ROMK wurden in der Diskussion erstellt und näher erläutert. Es ist davon auszugehen, dass einige dieser Proteine, speziell diese, die mit Tyrosinkinase und dem Aktin-Zytoskeletts assoziiert sind, auf ROMK Einfluss nehmen. Weitere Studien werden hoffentlich bald Aufschlüsse über Aktivitätsänderungen des ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanal, ROMK, offenbaren.

## Abkürzungen:

3-AT	3-Amino-1, 2, 4-triazol
Ade	Adenin
Ade <sup>-</sup>	Medium ohne Adeninzusatz
AH	Adenin-Hemisulfat
AH109	Hefestamm
AKAP79	A Kinase Anchoring Protein
ArgBP2	Arg/Abl-binding protein, Interaktionspartner von ROMK
ATP	Adenosintriphosphat
BL-21	E. coli-Bakterienzellen mit geringer Endoproteaseaktivität
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	copy DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
COS-Zellen	Ceropitheus aethiops (monkey, African green)-Zellen
DH5a	E. coli-Bakterienzellen zur cDNA-Transformation
DHR	Aminosäuresequenz (Aspartat-Histidin-Arginin)
Dlg	Drosophila disc large tumor suppressor
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DO-Lösung	Dropout-Lösung, Selektionsmedium für Hefezellen
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
Gal4	Transkriptionsfaktor der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Gal4-AD	Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4
Gal4-BD	Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4
GLGF	Aminosäuresequenz (Glycin-Leucin-Glycin-Phenylalanin)
GST	Gluthatione-S-Transferase
GST-ROMK	Fusionsprotein aus Gluthatione-S-Transferase-ROMK

H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
His <sup>-</sup>	Medium ohne Histidinzusatz
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranoside
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KC8	E. coli-Bakterienzellen, die ein Defekt im leuB-Gen haben
KG	Körpergewicht
Kir	Einwärts gleichrichtender Kalium-Kanal (Kalium inward rectifier)
KvLQT1	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, Interaktionspartner von ROMK
lacZ	Reporter Gen, falls aktiv, fällt der β-Galaktosidase-Versuch positiv aus
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leu <sup>-</sup>	Medium ohne Leucinzusatz
Leu	Leucin
M1 und M2	Transmembrandomänen von ROMK
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
mmol	Milimolar
Na <sup>+</sup>	Natriumion
Na <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -K <sup>+</sup> -Kotransporter	Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Pumpe	Natrium-Kalium-Pumpe
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
pACT2	Fischvektor, codiert für die Gal4-Aktivierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAS2-1	Ködervektor, codiert für die Gal4-Bindedomäne
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ-Domäne	Erkennungsdomäne für Protein-Protein-Interaktionen, abgeleitet aus den ersten Buchstaben der Proteine PSD 95, Dlg und ZO1
PEG	Polyethylen Glycol

pGEX4T3	Vektor der für das GST-Protein codiert
PIP2	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
POSH	Plenty of SH3s, Interaktionspartner von ROMK
Protein X	Interaktionsprotein von ROMK
Protein X-AD	Fusionsprotein aus einem in der cDNA-Nierenbibliothek enthaltenen Protein X fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne
PSD95	Mammalian Postsynaptic Density Protein 95
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
pTD1	Positiver Kontrollvektor
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	Rat outer medulla potassium channel
ROMK-Gal4BD	Fusionsprotein ROMK-Gal4Bindedomäne
SD	Selective-Drop-out
SD-Medium	Minimal Synthetic Dropout medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH2	Erkennungsdomäne für Protein-Protein-Interaktionen
SH3	Erkennungsdomäne für Protein-Protein-Interaktionen
TBS	Tris-bufferd-saline
Trp <sup>-</sup>	Medium ohne Tryptophanzusatz
Trp	Tryptophan
UAS	Upstream activation sequence
X-gal	5-brom-4-chloro-3 indolyl- $\beta$ -galactopyranoside
Y190	Hefestamm
YPDA-Medium	Hefemedium, dem Adenin zugesetzt wurde
YPD-Medium	Hefemedium
Zo1	Mammalian tight junction protein

## Literaturverzeichnis

- 1) **Rosa, R. M., M.E. Williams, and F.H. Epstein.** Extrarenal potassium metabolism. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by D.W. Seldin and G.H. Giebisch. New York: Raven, 1985, p2165
- 2.) **Matter, K. I. Mellmann.** Mechanism of cell polarity: Sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Biol.* 6 1994 545-554
- 3.) **Adler S, Fraley DS.** Potassium and intracellular pH. *Kidney Int.* 1977; 11:433-442
- 4.) **MacKnight ADC, Leaf A** Regulation of cellular volume. In: Andreoli TA, Hoffmann JF, Fanestil DD, eds. *Physiology of membrane disorders*. New York: Plenum, 1978:315-334
- 5.) **Brown, R.S.** Extranrenal potassium homeostatis. *Kidney Int.* , Vol. 30 1986 116-127
- 6.) **De Fronzo, R.A. and M. Bia.** Extranrenal potassium homeostasis. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, ed by D.W. Seldin and G.H. Giebisch, Raven. N.Y.
- 7.) **Stanton, B. A., and G. Giebisch** Renal Potassium transport. In: *Handbook of Physiology: Renal Physiology*, Bethesda, MD: Am Physiology. Soc., 1992, sect8, vol. 1 chapt. 19, p. 813-874
- 8.) **Giebisch G. and W. Wang.** Potassium transport: from clearance to channels and pumps. *Kidney Int.* 49: 1624-1631, 1996
- 9.) **Hille B.** Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA: *Sinauer*, 1992
- 10.) **Giebisch G.** Renal Potassium Channels: an overview. *Kidney Int.* 48: 1004-1009, 1995
- 11.) **Sackin, H.** Mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 333-353, 1995
- 12.) **Greger R.** Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle`s loop of mammalian nephron. *Physiol. Rev.* 65: 760-797, 1985
- 13.) **Greger, R., and H. Gögelein.** Role of K<sup>+</sup> conductance pathways in the nephron. *Kidney Int.* 31: 1055-1064, 1987
- 14.) **Wang W., S.C. Hebert and G. Giebisch.** Renal K<sup>+</sup> channels : structure and function. *Annu Rev. Physiol.* 59 : 413-416, 1997
- 15.) **Wang W., Sackin, and G. Giebisch.** Renal potassium channels and their regulation. *Annu Rev. Physiol.* 54 : 81-96, 1992

- 16.) **Wang W., and S.C. Hebert.** The molecular Biology of Renal K<sup>+</sup>channels. In Seldin DS, Giebisch G, *The Kidney, Physiology and Pathophysiology* 3<sup>rd</sup> edition, Raven, Philadelphia, PA, 1999
- 17.) **Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vasslev PM, Kanazirska MV and Hebert S.C.** Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362:31-38, 1993
- 18.) **Giebisch G.** Renal Potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol.* 274:F525-F531, 1998
- 19.) **Hebert S.C.** Potassium secretory channels in the kidney, in Jameson JL (ed): Principles of Molecular Medicine. Totowa, NJ, *Humana Press Inc.*, 1998, Ch. 67
- 20.) **Hebert S.C., and T.E. Andreoli.** Control of Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> transport in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol.* 246 (Renal fluid Electrolyte Physiol. 15) F745-756, 1984
- 21.) **Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert S.C.** The ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. II Cloning and intrarenal distribution of alternatively splice forms. *Am J Physiol.* 268:F1132-F1140, 1995
- 22.) **Zhou H, Tate SS, Palmer LG.** Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am J Physiol.* 266:C809-824, 1994
- 23.) **Shuck ME, Block JH, Benjamin CW, Tsai T-D, Lee KS, Slightom JL, Bienkowski MJ.** Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROMK potassium channel. *J Biol Chem* 269:24261-24270, 1994
- 24.) **Lee W-S, Hebert SC.** The ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. I Expression in rat distal nephron segments. *Am J Physiol.* 268:F1124-1131, 1995
- 25.) **Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J.** Association and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *Neuron* 18: 827-838, 1997
- 26.) **Koster JC, Bentle KA, Nichols CG, Ho K.** Assembly of ROMK 1 (Kir1.1a) inward rectifier K<sup>+</sup> channel subunits involves multiple interactions sites. *Biophys. J* 74:1821-1829, 1998

- 27.) **Yang J, Jan LY.** Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 1441-1447, 1995a
- 28.) **Fakler B, Bond CT, Adelman JP, Ruppersberg JP.** Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels form subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10), *Pflügers Arch* 433:77-83, 1996
- 29.) **Wang W, Giebisch G.** Dual modulation of renal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by protein kinase A and C. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9722-9725, 1991a
- 30.) **MacGregor GG, Xu J, Mc Nicholas CM, Giebisch G, Hebert SC.** Partially active channels produced by PKA site mutation of the renal K<sup>+</sup> channel ROMK2. *Am J Physiol.* 275:F415-422, 1998
- 31.) **Xu Z-C, Yang Y, Hebert SC.** Phosphorylation of the ATP- sensitive, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, ROMK, by cyclic AMP-dependet protein kinase. *J Biol. Chem.* 271:9313-9319, 1996
- 32.) **Ali S, Chen X, Lu M, Xu J-C, Lerea KM, Hebert SC, Wang W.** A kinase anchoring protein (AKAP) is required for mediating the effect of PKA on ROMK 1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:10274-10278, 1998
- 33.) **McNicholas CM, Wang W, Ho K, Hebert SC, Giebisch G.** Regulation of ROMK 1 K<sup>+</sup> channel activity involves phosphorylation processes. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 91:8077-8081, 1994
- 34.) **Hilgemann DW, Ball R.** Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP. *Science* 273:956-959, 1996
- 35.) **Huang C-L, Feng S, Hilgemann DW.** Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilzation by Gbg. *Nature* 391: 803-806
- 36.) **Baukrowitz FC, Schulte U, Oliver D. Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B.** PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* 282:1141-1144, 1998
- 37.) **McNicholas CM; MacGregor GG, Islas LD, Yang Y, Hebert SC, Giebisch G.** pH-dependent modulation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel ROMK. *Am J Physiol.* 275:F972-F981, 1998

- 38.) **Choe H, Zhou H, Palmer LG, Sackin H** A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance and gating. *Am J Physiol.* 273:F516-529, 1997
- 39.) **Palmer LG.** Potassium secretion and the regulation of distal nephron K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol* 277:F821-F825
- 40.) **Frindt G, Zhou H, Sackin H, Palmer LG.** Dissociation of K<sup>+</sup> channels density and ROMK mRNA in rat cortical collecting tubule during K<sup>+</sup> adaption. *Am J Physiol.* 274:F525-531, 1998
- 41.) **McNicholas CM, Nason MW, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC Giebisch G., Egan ME.** A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK-CFTR interaction. *Am J Physiol.* 273:F843-848, 1997
- 42.) **Rucknudin A, Schulze DH, Sullivan SK, Lederer WJ, Welling PA.** Novel subunit composition of a renal epithelial K<sub>ATP</sub> channel. *J Biol Chem* 273:14165-14171, 1998
- 43.) **Wang W, Cassola AC, Giebisch G.** Involvement of the cytoskeleton in modulation of apical K<sup>+</sup> channel activity in rat CCD. *Am J Physiol.* 267:F591-598, 1995
- 44.) **Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF.** Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9262-9266, 1991
- 45.) **Morales MM; Carroll TP, Morita T, Schwiebert EM, Devuyst O, Wilson PD, Lopes AG, Stanton BA, Dietz HC, Cutting GR.** Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol.* 270:F1038-F1048, 1996
- 46.) **Wang W.** Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. *Am J Physiol.* 278:F165-F171, 2000.
- 47.) **Wei Y, Bloom P, Chan M. and Wang W.** Protein tyrosine phosphatase reduces the number of apical small-conductance K<sup>+</sup> channels in the rat CCD. *J Biol Chem.* 275:F20502-20507.
- 48.) **Young K.H.** Yeast Two Hybrid: So many interactions, (in) so little time. *Molecular Genetic Screen Design*, American Cyanamid Co., Princeton, New Jersey 08543
- 49.) **Fanning A.S. and Anderson J.M.** PDZ Domain and the Formation of Protein Networks at the Plasma Membrane



- 50.) **Fanning A.S. and Anderson J.M.** Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Current Biology* Vol. 6 No. 11:1385-1388, 1999
- 51.) **Ponting C.P., Phillips C., Davies K.E. and Blake D.J.** PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays* Vol. 19 no. 6 469-479
- 52.) **Fanning A.S. and Anderson J.M.** PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *The Journal of clinical investigation* Vol. 103 No. 6 767-772, 1999
- 53.) **Kim E., Niethammer M., Rothschild A., Jan, Y.N. and Sheng M.** Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane associated guanylate kinases. *Nature* Vol. 378 85-88, 1995
- 54) **Gu RM., Wei Y., Falck JR., Krishna UM and Wen-Hui Wang.** Effects of protein tyrosine kinase and protein phosphatase on apical K<sup>+</sup>-channels in TAL. *Am J Physiol cell Physiol* 281:C1188-1195, 2001
- 55) **El-Mezgueldi M.** Calponin *Int J Biochem Cell Biol* Nov;28(11):1185-9, 1996
- 56) **Danninger C. Gimona M.** Live dynamics of GFP-calponin: isoform-specific modulation of the actin cytoskeleton and autoregulation by C-terminal sequences. *J Cell Sci* Nov;113 Pt 21:3725-36, 2000
- 57) **Applegate D., Feng W., Green RS. And Taubman MB.** Cloning and expression of a novel acidic calponin isoform from rat aortic vascular smooth muscle. *J Biol Chem* Apr 8;269(14):10683-90, 1994
- 58) **Alberts S. Arthur.** Identification of a Carboxyl-terminal Diaphanus-related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 4, 2824-2830, 2001
- 59) **Tominaga T, Sahai E, Chardin P, McCormick F, Courtneidge SA, AS.** Diaphanus-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signalling. *Mol Cell* 2000 Jan;5:13-25
- 60) **Law SF., Estojak J., Wang B., Mysliwiec T., Kruh G. and EA Golemis.** Human Enhancer of filamentation 1, a novel p130caslike do protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* Jul;16 (7):3327-37, 1996
- 61) **Manié NS., Beck R.P.A., Astier A., Sattler M., Salgia R., Griffin J.D., Golemis E.A. and Freedman A.S.** Involvement of p130<sup>cas</sup> and p105 HEF1, a Novel Cas-like

Docking Protein, in a cytoskeleton-dependent Signaling Pathway Initiated by Ligation of Integrin or Antigen Receptor on Human BCells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No.7, Issue of February 14, pp 4230-4236, 1997.

62) **Zhang Z., Hernandez-Lagunas L., Horne C.H. and Roland Baron.** Cytoskeleton-dependent Tyrosine Phosphorylation of the p130Cas Family Member HEF1 Downstream of the G Protein-coupled Calcitonin Receptor. *J Biol Chem*, Vol.274, Issue 35, 25093-25098, 1999

63) **Sheng M. and Eunjoon Kim.** The Shank Family of scaffold proteins. *Journal Cell Science* 113, 1851-1856, 2000

64) **Lim S., Naisbitt S., Yoon J., Hwang JI., Suh P-G., Sheng M. and Eunjoon Kim.** Characterization of the Shank Family of Synaptic Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.274, No.41, Issue of October 8, pp. 29510-29518, 1999

65) **Böckers T.M., Mameza M.G., Kretz M.R., Bockmann J., Weise C., Buck F., Richter D., Gundelfinger E.D. and Hans-Jürgen Kreienkamp.** Synaptic Scaffolding Proteins in Rat Brain. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No.43, Issue of October 26, pp 40104-40112, 2001

66) **Tapon N., Nagata K-I., Lamarche N. and Alan Hall.** A new Rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF $\kappa$ B signalling pathways. *The EMBO Journal* Vol. 17 No.5 pp. 1395-1404, 1998

67) **Dho S.E., French M.B., Woods S.A. and C. Jane McGlade.** Characterisation of Four Mammalian Numb Protein Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.274, No.46, Issue of November 12, pp. 33097-33104, 1999.

68) **Dho S.E., Jacob S., Wolting C.D., French M.B., Rohrschneider L.R. and C. Jane McGlades.** The Mammalian Numb Phosphotyrosine-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry* vol.273, No.15, Issue of April 10, pp. 9179-9187, 1998.

69) **Wang B., Golemis EA. And Gary D. Kruh.** ArgBP2, a Multiple SRC Homology 3 Domain-containing, Arg/Abl-interacting Protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed Cells and localized in Stress Fibers and Cardiocyte Z-disks. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 28, Issue of July 11, pp. 17542-17550, 1997

- 70) **Wade JB, Welling PA, Donowitz M, Shenolikar S, Weinmann EJ.** Differential renal distribution of NHERF isoforms and their colocalization with NHE3, ezrin, and ROMK. *Am J Physiol Cell Physiol* Jan;280(1):C192-8,2001
- 71) **Kocher O., Comella N., Tognazzi K., Brown LF.** Identification and partial characterization of PDZK1: a novel protein containing PDZ interaction domains. *Lab Invest* 1998 Jan;78(1):117-25
- 72) **Dibas AI., Mia AJ., Yoria T.** Aquaporins (water channels): role in vasopressin-activated water transport. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998 Dec; 219(3):183-99
- 73) **Skvorak A.B., Robertson N.G., Yin Y., Weremowicz S., Her H., Bieber F.R., Beisel K.W, Lynch E.D., Beier D.R. and Cynthia C. Morton.** An Ancient Conserved Gene Expressed in the Human Inner Ear: Identification, Expression Analysis, and Chromosomal Mapping of Human and Mouse Antiquitin (ATQ1). *Genomics* 46, 191-199 1997, Article No. GE975026
- 74) **Demolombe S., Franco D., De Boer P., Kupferschmidt S., Roden D., Pereon Y., Jarry A., Moorman A.F.M. and Denis Escande.** **Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia.** *Am J Physiol Cell Physiol* **280: C359-C372, 2001**
- 75) **Potet F., Scott D.J., Mohammad-Panah R., Escande D. and Isabelle Baró.** AKAP proteins anchor camp-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2038-H2045, 2001
- 76) **Debant A., Serra-Pages C., Seipel K., O'Brien S., Tang M., Park S.H. and Streuli M.** The multidomain protein TRIO binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (11), 5466-5471 1996
- 77) **Adler H.J., Winnicki R.S., Gong T.W. and Lomax M.I.** A gene upregulated in the acoustically damaged chick basilar papilla encodes a novel WD40 repeat protein. *Genomics* 56 (1), 59-69 1999
- 78) **Kedes L., Ng S.Y., Lin C.S., Gunning P., Eddy R., Shows T. and Leavitt J.** The human beta-actin multigene family. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 98, 42-46 1985
- 79) **Takazawa K., Go M., Togashi S., Endo T., Erneux C. and Onaya T.** Molecular cloning of inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase-C. *Unpublished*

- 80) **Fields S. and Song S.** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* Jul20;340(6230):245-6,1989
- 81) **Yang M., Wu Z. and Fields S.** Protein-peptide interactions analysed with the yeast two hybrid system. *Nucleic Acid Res.* 23(7): 1152-1156 1995
- 82) **Analysis of Protein Interaction.** Affinity Purification of Proteins Binding to GST Fusion Proteins, 20.2.10, Supplement 33, *Current Protocols in Molecular Biology*
- 83) **Endo M., Kurachi Y. and Mishina M.** ATP-Dependent Potassium Channels in the Kidney by Giebisch G., Wang W. And S.C. Hebert. Chapter 10, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 147 Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 200
- 84) **Kawabe H., Hata Y., Takeuchi M., Ide N., Mizoguchi A. and Yoshimi Takai.** nArgBP2, a Novel Neural Member of Ponsin/ArgBP2/vinexin Family that interacts with Synapse-associated Protein 90/Postsynaptic Density-95-associated Protein (SAPAP). *The Journal of Biological Chemistry* Vol.274, No 43, Issue of October 22, pp. 30914-30918, 1999.
- 85) **Gusev N.B.** Some Properties of Caldesmon and Calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. *Biochemistry (Mosc.)* Oct;66(10):1112-21, 2001, Review
- 86) **Kaneko T., Amano M., Maeda A., Goto H., Takahashi K., Ito M and Kaibuchi K.** Identification of Calponin as a novel substrate of Rho-Kinase. *Biochemical and Biophysical research Communications* Vol. 273, No 1, June 2000
- 87) **Leinweber BD., Laevis PC., Grabarek Z., Wang CL and Morgan KG.** Extracellular regulated Kinase (ERK) interaction with actin and the Calponin homology (CH) domain of actin binding protein. *Biochem J* Nov 15; 344 Pt 1:117-23, 1999
- 88) **Tobaben S., Südhof T. C. and Bernd Stahl.** The G Protein-coupled Receptor CL1 interacts directly with Proteins of the Shank Family. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 275, No.46, Issue of November 17, pp. 36204-36210, 2000
- 89) **Ehlers M.D.** Synaptic structure: Glutamate receptors connected by the shanks. *Current Biology* 9:R848-R850, 1999
- 90) **Santolini E., Puri C., Salcini A.E., Gagliani M.C., Pelicci P.G., Tacchetti C. and Pier Paolo Di Fiore.** Numb Is an Endocytic Protein. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 151, Number 6, December, 2000.

- 91) **Wei Y., Bloom P., Lin D., Gu R and Wang WH.** Effect of dietary K intake on apical small-conductance K channel in CCD: role of protein tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* Aug;281(2):F206-12, 2001
- 92) **Wang WH., Lin DH., Sterling H.** Regulation of ROMK channels by tyrosine kinase and tyrosine phosphatase. *Trends Cardiovasc Med* Apr;12(3):138-42, 2002
- 93) **Moral Z., Dong K., Wei Y., Sterling H., Deng H., Ali S., Gu R., Huang XY., Hebert SC., Giebisch G., Wang WH.** Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* Mar 9;276(10):7156-63, 2001
- 94) **Weinmann EJ.** New functions for the NHERF family of proteins *J Clin Invest* Jul;108(2):185-6, 2001
- 95) **Raghuram V., Mak DD., Foskett JK.** Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* Jan30;98(3):1300-5, 2001

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Stefan Silbernagl für die Betreuung der Dissertation und vor allem für die Möglichkeit diese Arbeit in den USA, Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University, New Haven, durchzuführen. Insbesondere die geduldige Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei Stipendienanträgen, Korrekturen von Posterpräsentation und die stets gewährten Ratschläge bei allen größeren und kleineren Problemen, all das wird mir in sehr angenehmer Erinnerung bleiben.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Gerhard Giebisch für die „Übernahme“ nach Yale und die Bereitstellung des Dissertationsthemas von ganzem Herzen bedanken. Seine Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit und seine Diskussionsbereitschaft werde ich nie vergessen. Sein Charisma, seine Menschenführung und sein Umgang mit Mitarbeitern werden mir ein Vorbild bleiben.

Auch Professor Michael Caplan, MD, PhD, möchte ich für die vorbildliche Betreuung im Labor und die Einweisung in die verschiedenen Labortechniken herzlichst danken. Sein Fachwissen und die ergebnisreichen Diskussionen haben mich geprägt. Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch allen Mitarbeitern im Labor von Michael Caplan aussprechen; insbesondere Mrs Vanathy Rajendran möchte ich für die moralische Unterstützung danken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls I des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg für die freundliche Aufnahme und die positive Atmosphäre. Hervorzuheben sind hier Herr Professor Dr. med. Michael Gekle und Herr Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt, die für alle Probleme in Würzburg eine Lösung hatten.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, meinen Eltern für die Unterstützung und Finanzierung meines Studiums und meines Aufenthaltes in den USA, meinem Bruder, meiner Freundin Angela und meinen Großeltern, von denen drei diesen Tag leider nicht erleben dürfen.

## Lebenslauf

Name: Marcel Philipp Roos

Geburtsdatum 16. August 1976

Geburtsort: Rüsselsheim

Eltern: Dr. Herbert Roos  
Hedi Roos, geb. Schneider

Schulbildung: Grundschule Königstädten 1983-1987  
Immanuel-Kant-Gymnasium Rüsselsheim 1987-1993  
St. Stithians College, JHB, Südafrika 1993-1994  
Immanuel-Kant-Gymnasium Rüsselsheim 1994-1996  
Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife am 17.06.1996

Hochschulbildung: Friedrich-Schiller-Universität Jena 1996-1997  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1997-1999  
Yale University, New Haven, CT, USA 1999-2000  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2000-2003  
Ludwig-Maximilians-Universität München 2003-2004  
Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung: September 1998  
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: August 1999  
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: März 2003  
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: April 2004

Beruf: seit Juli 2004 Arzt im Praktikum an der Abteilung für Nephrologie des Klinikums Rechts der Isar München.