

**Der plasmamembranassoziierte Transportregulator RS1
bindet Ubiquitin und gelangt in den Zellkern**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg**

vorgelegt von

Thomas Kühkamp

aus

Münster

Würzburg 2001

Eingereicht am: 29.05.2001

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. H. Koepsell

Gutachter: Prof. Dr. U. Scheer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt:

1. INHALTSVERZEICHNIS

SUMMARY.....	1
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	2
2. EINLEITUNG.....	3
2.1 Der Na ⁺ -D-Glucose Kotransporter SGLT1 und seine Regulation.....	3
2.1.1 SGLT1 im Darm.....	4
2.1.2 SGLT1 in LLC-PK ₁ Zellen.....	4
2.1.3 Heterologe Expression von SGLT1 in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	5
2.2 Das RS1-Protein.....	6
2.3 Die funktionellen Seiten des RS1.....	7
2.4 Die ersten Hinweise zur Wirkungsweise des RS1.....	8
2.5 Aufgabenstellung.....	9
3. MATERIAL und METHODEN.....	10
3.1 Mikroorganismen.....	10
3.2 Kulturbedingungen.....	10
3.2.1 Bakterienmedien.....	10
3.2.2 Vorkulturen.....	11
3.2.3 Hauptkulturen.....	11
3.3 Kompetente <i>E.coli</i> Zellen für die Elektroporation.....	11
3.3.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	11
3.3.2 Elektroporation und Selektion.....	12
3.4 DNA-Präzipitation.....	12
3.5 Alkalische Lyse.....	13
3.6 Präperative Plasmidisolierung.....	13
3.7 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	14
3.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	14
3.9 Modifikation von Nukleinsäuren.....	14
3.9.1 Restriktion von DNA.....	14
3.9.2 Auffüllen der Enden mit dem Klenow-Fragment.....	15
3.9.3 DNA-Ligation.....	15
3.9.4 Radioaktive Markierung.....	15
3.10 Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	16
3.11 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	16
3.12 Ligation des pRS1-Gens in den pRc/CMV-Vektor.....	17
3.13 Trunkierungen des pRS1-Gens.....	17
3.14 Expression des rekombinanten pRS1 in <i>E.coli</i>	18
3.15 RNA aus Zellkulturen.....	18
3.16 Poly(A) ⁺ -RNA.....	19
3.17 Gelelektrophorese von RNA.....	20
3.18 Northern-Transfer.....	20
3.19 Northern-Hybridisierung.....	21
3.20 Aufreinigung des rekombinanten pRS1.....	22
3.21 Antigene.....	23
3.22 Gewinnung polyklonaler Antisera.....	24

3.23	Titerbestimmung.....	25
3.24	Affinitätsreinigung der Antisera.....	26
3.25	Proteinbestimmung.....	27
3.26	SDS-PAGE	28
3.27	Silber-Färbung von PAA-Gelen.....	29
3.28	Westernblot.....	30
3.29	Zellfraktionierung.....	32
3.30	<i>In vitro</i> Phosphorylierung.....	35
3.31	Ubiquitin-Affinitätschromatographie.....	36
3.32	Zellkultur.....	37
3.32a	Passage.....	37
3.32b	Kryokultur.....	37
3.33	<i>In vivo</i> Phosphorylierung.....	38
3.34	Transfektionen von Zellen.....	38
3.34a	Transiente Expression.....	38
3.34b	Stabile Expression.....	39
3.35	Fluoreszenzmikroskopie.....	39
3.35a	Grün fluoreszierendes Protein.....	40
3.35b	RH 414	40
3.35	AMG-Aufnahme von LLC-PK ₁ Zellen	40
4.	ERGEBNISSE.....	42
4.1	Nachweis von RS1 bei verschiedenen Zellen im Westernblot.....	42
4.1.1	Optimierung der RS1-Detektion.....	42
4.1.2	Nachweis des RS1 in Dünndarmzellen vom Schwein.....	43
4.1.3	Nachweis von RS1 in Dünndarmzellen aus diabetischen Ratten.....	44
4.1.4	Nachweis von RS1 in Dünndarmzellen vom Schaf.....	45
4.1.5	Nachweis und subzelluläre Verteilung von RS1 in LLC-PK ₁ -Zellen.....	46
4.2	Lokalisierung des pRS1 mittels GFP-Fusion.....	48
4.3	pRS1 Trunkierungen und GFP-Fusion.....	51
4.4	Die UBA-Domäne im C-Terminus des pRS1-Proteins.....	57
4.5	Herstellung und Charakterisierung einer Zelllinie, die pRS1 stabil überexprimiert.....	62
4.6	RS1 und Endocytose.....	66
4.7	Phosphorylierung des pRS1-Proteins.....	67
5.	DISKUSSION.....	72
5.1	pRS1-Detektion im Westernblot.....	72
5.2	RS1 an der Plasmamembran.....	73
5.3	RS1 im Zellkern.....	74
5.4	RS1 im Zytoplasma.....	75
5.5	Der C-Terminus des pRS1.....	76
5.6	Die möglichen physiologischen Funktionen des RS1.....	78
5.6a	Wirkung an der Plasmamembran.....	78
5.6b	Funktion im Zellkern.....	80
5.7	Ist RS1 ein Signaltransduktionsprotein.....	81
5.8	Ein hypothetisches Modell zum Wirkmechanismus des RS1.....	82
5.9	Die möglichen Regulationen der RS1-Aktivität.....	84
5.9a	Der Einfluss der Kinasen.....	84
5.9b	Proteolyse.....	85

5.10	Experimenteller Ausblick.....	85
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
7.	ANHANG.....	98
7.1	Quantifizierung der pRS1-Konzentration in den BBM-Vesikeln aus der Niere.....	98
7.2	Kontrolle zur Trennung bei der Zellfraktionierung.....	99
7.3	Stabilität der Kernfluoreszenz bei GFP-pRS1 Zellen nach Behandlung mit Triton.....	100
7.4	Beobachtungen zur Regulation der Kernlokalisierung des GFP-pRS1(AS 1-582).....	100
7.5	Expression des pRS1 (AS 1-512) in HEK Zellen.....	101
7.6	<i>In vivo</i> Phosphorylierung des GFP-pRS1-Proteins.....	102
7.7	Anti-RS1 Seren.....	103
7.8	Die RS1 knock-out Maus.....	104
7.9	Abkürzungsverzeichnis.....	106
7.10	Lebenslauf.....	108

SUMMARY

This work describes investigations about the subcellular distribution and function of the plasma membrane-associated protein RS1, an regulator of plasma membrane transporters like the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 or the organic cation transporter OCT2 (Vehyl et al., 1993; Reinhardt et al., 1999; Valentin et al., 2000).

The green fluorescent protein (GFP) was fused to RS1 from pig (pRS1) and expressed in LLC-PK₁ cells. The GFP-pRS1 protein could be detected at the plasma membrane, in the cytoplasm and in the nucleus. Expression of various truncated forms of GFP-pRS1 showed that the N-terminal half of pRS1 (amino acids 1-328) is not necessary for the migration of pRS1 into the nucleus. In contrast, truncations of the C-terminus inhibited translocation into the nucleus.

The C-terminus of pRS1 contains a conserved ubiquitin associated domain (UBA) at amino acids 579 to 616. Affinity chromatography with ubiquitin-conjugated Sepharose beads showed a noncovalent binding of pRS1 to immobilized ubiquitin, which was abolished in the presence of an excess of free ubiquitin. Further analysis showed that the C-terminal 111 amino acids were indispensable for ubiquitin binding.

A conserved di-leucine signal (pRS1 336/337) is a well known endocytosis motif and points to an involvement of pRS1 in the internalisation of plasma membrane proteins. This hypothesis was supported by the finding of an increased uptake of the intercalating membrane dye RH 414 in a pRS1-overexpressing LLC-PK₁ cell line.

Based on this findings together with previous data, a model for the physiological role of RS1 was proposed. In this model, RS1 serves as an adaptor which links ubiquitinated plasma membrane transporters such as SGLT1 to the endocytosis machinery. Moreover RS1 migrates into the nucleus and is involved in the transcriptional suppression of SGLT1.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse über die subzelluläre Verteilung und die Funktion des RS1-Proteins vom Schwein (pRS1), einem Regulator von Plasmamembrantransportern. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde mit pRS1 fusioniert und in LLC-PK₁ Zellen exprimiert. Das GFP-pRS1 Fusionsprodukt (96 kD) konnte an der Plasmamembran, im Zytosol und im Zellkern entdeckt werden. Bei GFP-Fusion mit trunkierten pRS1-Proteinen zeigte sich, dass der C-Terminus die Kernlokalisierung beeinflusst. Dagegen wurde die Kernlokalisierung durch eine Trunkierung des N-Terminus nicht gestört.

Im C-Terminus des pRS1 konnte von AS 579 bis 616 eine Ubiquitin associated domain (UBA) identifiziert werden, die auch in den anderen bisher bekannten RS1-Proteinen aus Mensch, Kaninchen und Maus konserviert vorliegt. Eine Ubiquitin-Affinitätschromatographie zeigte, dass das pRS1-Protein Ubiquitin auf nicht kovalente Weise bindet. Nach der Trunkierung der UBA-Domäne war keine Wechselwirkung des pRS1-Proteins mit Ubiquitin mehr feststellbar.

Ein konserviertes Di-Leucin-Endozytose-Motiv (pRS1 AS 366/67) deutet eine Funktion des pRS1-Proteins bei der Internalisierung von Plasmamembranproteinen an. Deshalb wurde das Endozytoseverhalten von pRS1 überexprimierenden LLC-PK₁ Zellen untersucht, wobei sich zeigte, dass diese Zellen eine deutlich höhere Aufnahme des Endozytosefarbstoffes RH 414 aufwiesen als Zellen, die pRS1 nicht überexprimierten.

Die in dieser Arbeit gesammelten Daten zum RS1-Protein wurden zusammen mit früher erhobenen Ergebnissen zum RS1-Protein im Rahmen eines Modells zusammengefasst. In diesem hypothetischen Modell wird angenommen, dass RS1 ein Adapterprotein ist, welches die ubiquitinabhängige Endozytose von Plasmamembrantransportern vermittelt und als Signalmolekül in den Zellkern gelangen kann, wo es an der Transcriptionsrepression des SGLT1 beteiligt ist.

2. EINLEITUNG

Zu den wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung von Leben gehörte die Bildung eines diffusionsbegrenzten Reaktionsraumes. Bei den Zellen wird diese wichtige Aufgabe von der Plasmamembran erfüllt. Weil zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen gleichzeitig ein gezielter Stoffaustausch und eine Energieaufnahme notwendig sind, funktioniert die Plasmamembran wie ein selektiver Filter. Die Plasmamembran besteht aus Lipid- und Proteinmolekülen, die hauptsächlich durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Hydrophobe Moleküle wie z.B. O₂, N₂ und Benzol oder kleine ungeladene, polare Moleküle wie CO₂, H₂O, Harnstoff und Glycerin können leicht durch eine Lipiddoppelschicht diffundieren. Große ungeladene, polare Moleküle wie Glucose und Saccharose oder Ionen wie Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ und Mg²⁺ hingegen sind zum Überwinden der Plasmamembran auf bestimmte Transmembranproteine angewiesen.

Für den Transport von Glucose durch die Plasmamembran werden zwei wichtige Klassen von Transportern voneinander unterschieden. Die GLUT-Transporter (Glucose-Transporter; zur Übersicht Gould und Holman, 1993) erlauben durch eine erleichterte Diffusion die passive Aufnahme bzw. Abgabe von Glucose entlang eines Glucosegradienten. Der Na⁺-abhängige D-Glucose-Kotransporter SGLT1 (zur Übersicht Turk and Wright, 1997) ermöglicht dagegen die aktive Aufnahme von Glucose. Die wechselnden extrazellulären Konzentrationen von Glucose erfordern von den Zellen eine dauernde Adaption der Aktivität der Glucose-Transportproteine.

2.1 Der Na⁺-D-Glucose Kotransporter SGLT1 und seine Regulation

SGLT1 ist ein sekundär aktiver Glucosesymporter, welcher unter Ausnutzung des zelleinwärts gerichteten Na⁺-Gradienten Glucose aktiv in Zellen transportiert und so die Aufnahme von Glucose auch gegen einen Glucose-Konzentrationsgradienten ermöglicht. SGLT1 wird am stärksten in den luminalen Bürstensaummembranen der Dünndarm-Epithelzellen (Takata et al., 1992) und im S3 Segment des proximalen Nierentubulus exprimiert (zur Übersicht Hediger and Rhoads, 1994; Koepsell and Spannenberg, 1994). Auch im Gehirn scheint der SGLT1 eine wichtige Rolle zu spielen (Pope et al., 1997).

Die Regulation der Aktivität des SGLT1 erfolgt auf verschiedenen Ebenen, wie Transcription, mRNA-Stabilität oder Endo-, Exozytose. Zu verschiedenen Zellen wurden bisher unterschiedliche Regulationsmechanismen beschrieben.

2.1.1 SGLT1 im Darm

Die Aktivität vom SGLT1 im Dünndarm wird durch die Glucosekonzentration im Darmlumen reguliert. Mit zunehmendem Glucosegehalt steigt die Transportaktivität des SGLT1. Beim Schaf sind die Auswirkungen der Glucose auf den SGLT1 besonders gründlich untersucht worden. Nach dem Abstillen der Lämmer kommt es zu einer natürlichen Reduzierung des Glucoseangebotes im Darmlumen, was parallel zu einer drastischen Verminderung der SGLT1-Aktivität führt (Shirazi-Beechey et al., 1991). Beim adulten Schaf steigt die Aktivität des SGLT1 erst nach einer glucosereichen Ernährung über eine Darmsonde wieder deutlich an. Dabei erhöht sich die Anzahl der SGLT1-Proteine in den Bürstensaummembranen proportional zur Aktivitätszunahme des SGLT1. Während die Anzahl der SGLT1-Proteine um das mehrfache steigt, kann für die SGLT1-mRNA nur ein Anstieg bis zum zweifachen festgestellt werden (Lescale-Matys et al., 1993). Somit ist der Einfluss der Glucose auf den SGLT1 größtenteils auf posttranscriptionale Prozesse zurückzuführen.

Auch Krankheiten beeinflussen die Aktivität des SGLT1 im Darm. So verursacht ein akuter unbehandelter Diabetes einen Anstieg der SGLT1-Proteine in den Bürstensaummembranen, ohne dass sich die Konzentration der SGLT1-mRNA verändert. Erst bei einer Behandlung mit Insulin sinkt die Konzentration der SGLT1-Moleküle wieder auf Normalmass, ohne die mRNA Konzentration des SGLT1 zu verändern (Kurokawa et al., 1995). Somit scheint auch Insulin posttranscriptional auf die Aktivität des SGLT1 zu wirken.

Chronische Entzündungen des Dünndarms führen zur einer Verminderung der SGLT1-Proteine in den Bürstensaummembranen. Bei Behandlung mit Glucocorticoiden wird die Anzahl der SGLT1-Moleküle auf bisher noch unbekannte Weise wieder erhöht. Bei gesunden Kaninchen verändert die intramuskuläre Injektion von Glucocorticoiden die Transportaktivität des SGLT1 hingegen nicht (Sunadaram et al., 1999).

2.1.2 SGLT1 in LLC-PK₁ Zellen

In der Niere spielt SGLT1 bei der aktiven Rückresorption von Glucose aus dem Primärharn eine wichtige Rolle. Aus dem S3-Segment des proximalen Nierentubulus vom Schwein konnte die epitheliale Zelllinie LLC-PK₁ gewonnen werden, die den SGLT1 endogen exprimiert (Hull et al., 1976). In den LLC-PK₁ Zellen wird die physiologische Aktivität des SGLT1 von den Faktoren Glucoseangebot und Zelldichte beeinflusst.

Im Gegensatz zu der Wirkung der Glucosekonzentrationen im Darm (2.1.1) verursachen D-Glucose-Konzentrationen von mehr als 5 mM im Nährmedium eine drastische Reduzierung

der Transportaktivität des SGLT1 (Moran et al., 1983). Die hohen Glucosekonzentrationen führen auf noch unbekannt Weise zu einer Abnahme der SGLT1-mRNA (Ohta et al., 1990). Es bleibt bisher ungeklärt, ob die dabei festgestellte verringerte Konzentration an SGLT1-mRNA die Folge einer Reduzierung der Transcriptionsrate oder einer Destabilisierung der SGLT1-mRNA ist.

Auch die Zelldichte wirkt auf noch relativ ungeklärte Weise auf die Konzentration der SGLT1-mRNA. Die LLC-PK₁ Zellen sind Epithelzellen und bilden beim Wachstum einen Monolayer aus. Die Differenzierung zu einer polarisierten Zellstruktur erfolgt erst im geschlossenen Zellverband mit ausgebildeten Zell-Zellkontakten. Erst dann ist eine deutliche Konzentration an SGLT1-mRNA feststellbar (Yet et al., 1994; Shioda et al., 1994). Nach Zerstörung der Zell-Zellkontakte nimmt die SGLT1-Aktivität durch die Reduzierung der SGLT1-mRNA schnell wieder ab (Van den Bosch et al., 1991). Die Proteinkinase C (PKC) scheint an dieser schnellen Abnahme der SGLT1-mRNA beteiligt zu sein, denn bei Inhibierung der PKC-Aktivität konnte die SGLT1-mRNA trotz Zerstörung der Zell-Zellkontakte stabilisiert werden (Shioda et al., 1994). Bei Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolster in differenzierten LLC-PK₁ Zellen ist eine schnelle Abnahme der SGLT1-mRNA feststellbar. Hingegen bewirkt die Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A (PKA) eine Stabilisierung der SGLT1-mRNA (Peng and Lever, 1995). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine uridinreiche Sequenz (URE) im 3'-Bereich der untranslatierten Region der SGLT1-mRNA für die Destabilisierung verantwortlich ist. Bei Störung der Interaktion dieser URE mit einem nukleo-zytoplasmatischen 38 kD Protein wurde die durch cAMP-vermittelte Stabilisierung der SGLT1 mRNA aufgehoben (Lee et al., 2000). Es scheint, als ob die Wirkung der PKA auf die SGLT1-mRNA durch dieses noch unbekannt 38 kD Protein verursacht wird.

2.1.3 Heterologe Expression von SGLT1 in *Xenopus* Oocyten

Die Expression von klonierten SGLT1-Proteinen in Oocyten des *Xenopus laevis* ermöglicht eine gute Charakterisierung der Transportaktivitäten dieses Proteins. In diesem System kann die Regulation des SGLT1 unabhängig von den transcriptionellen Einflüssen des natürlichen Promotors untersucht werden. Dabei wurden wichtige Erkenntnisse über die Wirkungen der Proteinkinasen auf die Aktivität des SGLT1 gesammelt. Nach Stimulation der Proteinkinasen verändern sich die maximalen Transportraten deutlich. Wenige Minuten nach Aktivierung der PKA mit zyklischem 8-Bromo-Adenosin 3',5'-Monophosphat (8-Br-cAMP) kann ein Anstieg der Transportraten für die SGLT1-Proteine aus Kaninchen, Ratte und Mensch beobachtet

werden. Bei Stimulation der PKC mit *sn*-1,2-Dioctanoylglycerol (DOG) ist die Wirkung auf die Aktivität der verschiedenen SGLT1-Proteine unterschiedlich. Während die Transportraten für den SGLT1 aus Ratte und Kaninchen sinken, kann für den menschlichen SGLT1 eine Steigerung gemessen werden (Hirsch et al., 1996; Wright et al., 1997). Die Ursachen für die uneinheitliche Wirkung der PKC auf die verschiedenen SGLT1-Moleküle sind noch nicht geklärt, werden aber im Zusammenhang mit den Sequenzunterschieden vermutet.

Für eine schnelle Veränderung der Transportleistung des SGLT1 kann entweder eine Veränderung in der Anzahl der Transporter in der Plasmamembran oder eine direkte Beeinflussung der Aktivität des Transporters in Betracht gezogen werden. So wird z.B. die Aktivität des Glutamat-Kotransporter im Gehirn durch eine spezifische Phosphorylierung direkt reguliert (Casado et al., 1993). In der Sequenz des SGLT1 aus Mensch, Ratte und Kaninchen sind vier konservierte potentielle Phosphorylierungssequenzen für die PKC vorhanden. Für die PKA existiert eine konservierte potentielle Phosphorylierungsstelle, die aber im Ratten SGLT1 nicht vorhanden ist (Turk et al., 1996). Trotzdem konnte für den Ratten-SGLT1 eine direkte PKA abhängige Phosphorylierung demonstriert werden (Ishikawa et al., 1997). Eine PKC abhängige Phosphorylierung konnte für noch kein SGLT1-Molekül gezeigt werden.

Die Stimulation der Proteinkinasen in den *Xenopus* Oocyten führen zu einer Veränderung der Anzahl der SGLT1-Moleküle in der Plasmamembran, die mit einer entsprechenden Veränderung der Membranoberfläche korreliert. Unabhängig von der Frage einer direkten Phosphorylierung der SGLT1-Protein scheint die Wirkung der Kinasen auf Veränderungen beim Ein- und Ausbau des SGLT1 in die Plasmamembran zu zielen (Hirsch et al., 1996; Wright et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit die Transportaktivität von SGLT1 zu verändern, besteht in einer direkten oder indirekten Beeinflussung durch andere Proteine. So kann der Transport des SGLT1 in Oocyten durch Koexpression des RS1-Proteins, welches in der Arbeitsgruppe von Prof. Koepsell kloniert wurde, verändert werden (Veyhl et al., 1993).

2.2 Das RS1-Protein

Die Entdeckung des RS1-Proteins geht auf Versuche zurück, den Na^+ -D-Glucosekotransporter (SGLT1) aus dem Schwein zu charakterisieren. Beim Immunscreening einer c-DNA-Expressionsbank der Schweineniere wurde ein intronloses Gen entdeckt, welches ein 623 AS langes Polypeptid kodiert (Veyhl et al., 1993). Nach Expression des RS1-

Proteins aus dem Schwein (pRS1) in *Xenopus* Oocyten kann das pRS1-Protein in der Plasmamembranfraktion detektiert werden. Das pRS1-Protein ist nur mit einem lipidlöslichen Biotinderivat markierbar, was die intrazelluläre Orientierung des pRS1 verdeutlicht (Valentin et al., 2000).

RS1-Proteine sind bisher aus dem Schwein (pRS1), dem Menschen (hRS1), dem Kaninchen (rbRS1) und der Maus (mRS1) kloniert worden (Veyhl et al., 1993; Lambotte et al., 1996; Reinhardt et al., 1999; Baumgarten, 1999) und sie stammen von einem intronlosen „Single copy Gen“ (Lambotte et al., 1996; Reinhardt et al., 1999). Die RS1-Proteine besitzen je nach Spezies eine Länge von 582 bis 623 Aminosäuren. Ihre Homologie liegt durchschnittlich bei 70 %. Die konservierten Aminosäuren beschränken sich größtenteils auf sehr kurze Abschnitte über die gesamte Sequenz. Der auffallend größte zu 100 % konservierte Abschnitt liegt im C-Terminus und umfasst 35 Aminosäuren. Von den letzten 15 Aminosäuren haben 13 Aminosäuren hydrophobe Reste.

Alle RS1-Proteine besitzen 2 konservierte potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und 3 für die Caseinkinase II (CaK II) (Baumgarten, 1999).

2.3 Die funktionellen Seiten des RS1

Aufgrund der Vorstellung, dass es sich bei RS1 um eine spezifische regulatorische Untereinheit des SGLT1 handelt (Koepsell and Spannenberg, 1994), konzentrierten sich die Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zunächst auf die Charakterisierung der Beeinflussung des SGLT1. Dazu wurde RS1 gemeinsam mit SGLT1 in Oocyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert. Durch Vergleich der kinetischen Daten des SGLT1 mit und ohne Koexpression des RS1 wurden wichtige Informationen über die Eigenschaften des RS1 gewonnen. So kann bei der Koexpression des menschlichen RS1 (hRS1) mit dem menschlichen SGLT1 (hSGLT1) eine Reduzierung des V_{\max} -Wertes für den SGLT1-abhängigen Transport beobachtet werden (Lambotte et al., 1996). Später zeigte sich, dass sich die Wirkung des RS1 nicht auf den SGLT1 beschränkt. Bei Koexpression des RS1 aus Kaninchen (rbRS1) mit dem Organischen Kationentransporter vom Menschen (hOCT2) wurde auch eine inhibierende Eigenschaft des RS1 auf die Transportaktivität des OCT2 beobachtet, die ebenfalls zu einer Reduzierung des V_{\max} -Wertes führt (Reinhardt et al., 1999). RS1 wirkt somit in ähnlicher Weise auf zwei Transporter, die zu unterschiedlichen Proteinfamilien gehören.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die LLC-PK₁ Zellen auch RS1 endogen transkribieren (Veyhl et al., 1993), ergab sich die Möglichkeit, RS1 in einem natürlichen System gezielter zu untersuchen. Man entschied sich, die physiologischen Auswirkungen einer Reduzierung der endogenen pRS1-Expression in den LLC-PK₁ Zellen zu analysieren. Durch die stabile Transfektion mit einem pRc/CMV-RS1 anti-sense Konstrukt konnte die endogene Translation des pRS1 vermindert werden. Diese LLC-PK₁ Zellen zeigen eine deutliche Stimulation der endogenen SGLT1-Transportaktivität. Die Menge der SGLT1-Proteine in der Plasmamembran und auch die Konzentration der SGLT1-mRNA steigt ca. um den Faktor 10 (Korn, 1999). Während die Ergebnisse zum RS1 bei Expression in *Xenopus* Oocyten transcriptionsunabhängig sind, kann nun in den RS1 anti-sense LLC-PK₁ Zellen ein Einfluss des RS1 auf die SGLT1- und OCT2-mRNA beobachtet werden. Die bis dahin gesammelten Erkenntnisse zum RS1 wurden in einem Modell zusammengefasst.

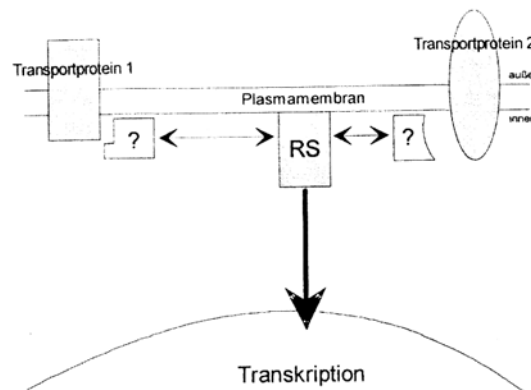


Abb.2-1: Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise des RS1 (Korn, Dissertation 1999)

Die Interaktion des RS1 mit verschiedenen Plasmamembrantransportern vollzieht sich auf der zytosolischen Seite über postulierte Adapter-Proteine. Als Folge dieser Interaktion kommt es letztlich auf noch unbekannt Weise zur Beeinflussung der Transkription dieser Plasmamembrantransporter.

2.4 Die ersten Hinweise zur Wirkungsweise des RS1

Das Modell zur Wirkungsweise des RS1 [Abb. 2-1] deutet zwar eine Funktion des RS1 als Signaltransduktionsmolekül zwischen der Plasmamembran und dem Zellkern an, enthält aber weder eine Erklärung für die transcriptionsunabhängige Beeinflussung der SGLT1- und OCT2-Transportaktivitäten in *Xenopus* Oocyten, noch für die Veränderung der mRNA-Konzentrationen des SGLT1 und OCT2 in LLC-PK₁ Zellen.

Die transcriptionsunabhängige Hemmung der SGLT1-Aktivität durch RS1 in Oocyten konnte durch Untersuchungen von Marc Valentin genauer beschrieben werden. Es zeigte sich

nämlich, dass sich die Konzentration der SGLT1-Moleküle in der Plasmamembran bei Koexpression mit RS1 reduziert (Valentin et al., 2000). Die Reduzierung der SGLT1-Proteine in der Plasmamembran korreliert dabei mit dem Rückgang der SGLT1-Transportleistung. So konnte erkannt werden, dass RS1 die Präsenz des SGLT1 in der Plasmamembran beeinflusst, was die Abnahme der maximalen Transportraten erklärt.

2.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Dissertation sollte weiter untersucht werden, wie RS1 einerseits die Konzentration des SGLT1 in der Plasmamembran transcriptionsunabhängig beeinflusst und wie sich andererseits die Wirkung des RS1 auf die mRNA-Konzentration des SGLT1 erklärt. Dazu sollte die subzelluläre Verteilung des RS1 in LLC-PK₁ Zellen analysiert werden. Um die Wirkungsweise des RS1 auf die Expression des SGLT1 besser zu verstehen, sollten RS1 stabil überexprimierende Zellen geschaffen und untersucht werden.

3. MATERIAL und METHODEN

Für alle molekular- und zellbiologischen Arbeitsschritte wurden ausschließlich sterilisierte Materialien eingesetzt. Die Sterilisation der Lösungen und Kunststoffartikel wurde durch Autoklavierung erreicht (20 min, 121°C, 2.1 bar). Thermolabile Lösungen konnten durch Sterilfiltration entkeimt werden. Glas- und Metallwaren wurden mit Hilfe trockener Hitze bei 180°C für 1h sterilisiert. Um die Gefahr mikrobiologischer Kontaminationen zu minimieren, wurden die Arbeitsflächen mit UV-Licht und/oder 70%igem Ethanol entkeimt. Nach Möglichkeit wurden alle kontaminationsgefährdeten Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchgeführt.

3.1 Mikroorganismen

Folgende *E.coli* Stämme kamen zum Einsatz:

DH10B (Grant et al., 1990)

Dieser Stamm diente zur Selektion und Amplifizierung von Plasmid-DNA.

BL21[DE3] (Studier and Moffert, 1986)

Dieser Stamm wurde zur Proteinexpression eingesetzt.

3.2 Kulturbedingungen

Die Lagerung und Sicherung der Bakterienstämme erfolgten in Form von Kryokulturen.

Die Bakterienkulturen, welche eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht hatten, wurden mit sterilfiltriertem Glycerin auf eine Endkonzentration von 15 % (v/v) eingestellt und konnten anschließend bei -70°C gelagert werden.

3.2.1 Bakterienmedien

LB-Medium: 2 % Bacto-Tryptone (w/v), 0.5 % Hefeextrakt (w/v), 170 mM NaCl, pH 7.0

SOB-Medium: 2 % Bacto-Tryptone (w/v), 0.5 % Hefeextrakt (w/v), 10 mM NaCl,

2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.0

SOC-Medium: SOB-Medium, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

Um feste Nährmedien zu erhalten, wurde zusätzlich 1.5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugefügt.

Die hitzeempfindlichen und deshalb sterilfiltrierten Antibiotika durften erst nach Abkühlung der Nährmedien unter 60°C zugesetzt werden. Folgende Antibiotika wurden zur Selektion verschiedener Vektoren eingesetzt:

- für den pRc/CMV-(Invitrogen, Leek, Niederlande), pET22b(+)- und pBluescriptSKII(-) (Stratagene, Heidelberg, Deutschland)-Vektor 100 µg Ampicillin pro ml Nährmedium
- für den pEGFP-Vektor (Clontech, Heidelberg, Deutschland) 30 µg Kanamycin pro ml Nährmedium

3.2.2 Vorkulturen

10 µl einer aufgetauten Kryokultur wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschank bei 37 °C kultiviert. Einzelne sichtbare Kolonien dienten zur Animpfung eines Nährmediums von 2 bis 5 ml. Bei 37°C und 300 rpm auf einem Rotationsschüttler konnten sich die Bakterien adaptierten und vermehren.

3.2.3 Hauptkulturen

Für die Hauptkulturen wurden autoklavierte 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet, die 125 ml Nährmedium enthielten. Die Hauptkulturen wurden 1 zu 100 mit der Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37°C und 300 rpm

3.3 Kompetente *E.coli* Zellen für die Elektroporation

3.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Vier 250 ml SOB-Medium ohne Magnesiumsalz wurden mit je 1ml Vorkultur aus *E.coli* [DH10B] angeimpft. Die Verwendung von 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen ermöglichte eine optimale Vermehrung. Bei 37 °C wuchsen die Zellen auf einem Rotationsschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 1.0. Anschließend wurden die Kulturgefäße in Eiswasser abgekühlt. Nach Zentrifugation mit 2.000 g bei 4 °C wurden die sedimentierten Bakterien in 500 ml 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in soviel Glycerinlösung aufgenommen, dass sich eine OD₆₀₀ von 2.0 einstellte. Bis zu ihrer Verwendung wurden die elektrokompetenten Bakterien bei – 70°C gelagert.

3.3.2 Elektroporation und Selektion

20 µl elektrokompetenter Bakterien (3.2) wurden mit 1 µl der Plasmid-DNA gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Nach einem Spannungsstoß (1.6 kV, 5 msec, Biojet MI) wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium suspendiert und 1 h im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. 100 bis 400 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agar-Nährmedium mit entsprechendem Antibiotikum großflächig ausgestrichen. Nach 16 h bei 37 °C waren die transformierten Bakterien zu sichtbaren Kolonien herangewachsen.

Von den gewonnenen Klonen wurden Vorkulturen (3.2.2) angeimpft und außerdem wurden die Klone zur vorläufigen Sicherung auf eine neue Agarplatte ausgestrichen, die nach 16 h bei 37°C bei 4°C für ca. 14 Tage gelagert werden konnte.

3.4 DNA-Präzipitation

Für die Fällung von DNA wurden je nach Anforderung verschiedene Methoden eingesetzt. Welche Methode jeweils zum Einsatz kam, wird in den weiteren Beschreibungen aufgeführt.

Fällung mit Natriumacetat und Ethanol:

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.3) und 2.5 Volumen 96%iger Ethanolösung zur DNA-Lösung fiel die DNA bei – 20 °C (> 2 h) aus. Als Präzipitierhilfe konnte auch 2.5 µg Polyacrylamid zugegeben werden, was eine sofortige Zentrifugation ermöglichte.

Fällung mit Natriumacetat und Isopropanol:

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.3) und 0.8 Volumen Isopropanol wurde die DNA-Lösung sofort zentrifugiert.

Der Überstand (30 min, 14.000 g) wurde verworfen und das DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde nach Abnahme des Überstandes und Lufttrocknung in einem angemessenen Volumen Puffer bzw. Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei – 20 °C.

3.5 Alkalische Lyse

(Birnboim und Doly, 1979)

Die alkalische Lyse diente der Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*. Durch eine starke Alkalisierung und SDS-Behandlung wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Dabei denaturierten sowohl die Proteine als auch die DNA. Bei Neutralisierung des pH-Wertes konnte sich die Plasmid-DNA aufgrund ihrer geringen Größe in Gegensatz zur genomischen DNA renaturieren.

3 ml Vorkulturen (3.2.2), die über Nacht gewachsen waren, wurden 3 min bei 1.500 g sedimentiert und in 0.3 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen durch die Zugabe von 0.3 ml Puffer 2 aufgeschlossen und mussten anschließend 3 bis 4 min auf Eis inkubieren. Es folgte unmittelbar eine Zugabe von 0.3 ml Puffer 3. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 12.000 g konnten die genomische DNA und viele Proteine sedimentiert werden. Die Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol (3.4) aus dem Überstand gefällt, kurz getrocknet und in 10 bis 20 µl Wasser gelöst.

Puffer 1: 10 mM EDTA, 50 mM Tris / HCl pH 8.0 und 100 µg RNase/ml

Puffer 2: 200 mM NaOH und 1 % (w/v) SDS

Puffer 3: 3 M Kaliumacetat pH 5.3

3.6 Präperative Plasmidisolierung

Bei der Reinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien-Hauptkulturen mit mehr als 25 ml wurde ein Qiagenfilter Plasmid Kit (Hilden, Deutschland) eingesetzt. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt (Qiagen Plasmid Purification Handbook, July 99).

Die Reinigung der Plasmide arbeitete nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (3.5) und Anreicherung der Plasmid-DNA über einen Anionenaustauscher. Nach der Neutralisierung des pH-Wertes wurde das Lysat mittels einer Filtration geklärt. Bei Bedarf wurde dem Lysat Endotoxin-Removal-Puffer (EndofreeTM Plasmid Maxi Kit, Qiagen) zugegeben, um enthaltene Endotoxine im nächsten Reinigungsschritt nicht an den DEAE-Anionenaustauscher binden zu lassen. Nach dem Waschen der Säulenmatrix wurde die Plasmid-DNA mit einem Puffer, der 1.25 M NaCl enthielt, eluiert. Die DNA konnte mit Isopropanol (3.4) gefällt und in Wasser bzw. Puffer gelöst werden.

3.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Ankonzentrierung von DNA und Entfernung von Proteinen und Salzen aus DNA-Lösungen wurde häufig eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zuerst wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Phenol (1:1)-Lösung ausgeschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation von 7 min bei 9.000 g, wobei sich die DNA in der oberen wässrigen Phase sammelte. Nach der Extraktion der wässrigen Phase mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (49:1 v/v) und einer erneuten Zentrifugation konnten weitere Verunreinigungen entfernt werden.

3.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Extinktion (Ex.) der Probe bei 260 nm diente der Abschätzung der DNA bzw. RNA-Konzentration. Ein Wert von 1.0 entspricht 50 µg bei doppelsträngige DNA / ml bzw. 40 µg bei RNA/ml.

$$\text{dsDNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{Ex}_{.260} / 50$$

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{Ex}_{.260} / 40$$

Die Kontamination der Nukleinsäureprobe mit Protein konnte durch die Berechnung des Extinktionsquotienten aus 260 und 280 nm bestimmt werden.

$$\text{reine ds DNA} = \text{Ex}_{.260} / \text{Ex}_{.280} = 1.8$$

$$\text{reine RNA} = \text{Ex}_{.260} / \text{Ex}_{.280} = 2.0$$

3.9 Modifikation von Nukleinsäuren

3.9.1 Restriktion von DNA

Das spezifische Schneiden von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen des Typs II, um innerhalb einer charakteristischen doppelsträngigen Nukleotidsequenz gezielt Phosphodiesterbindung in beiden Strängen zu hydrolysieren. Die Restriktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Beimengung der Enzymlösung unter 10 % (v/v) des Gesamtvolumens gehalten, um die Reaktion nicht durch das enthaltene Glycerol zu stören. Die Reaktion konnte durch eine Denaturierung des Restriktionsenzym bei 70°C für 10 min bzw. durch eine sofortige Phenol-Chloroform-Extraktion (3.7) gestoppt werden.

3.9.2. Auffüllen der Enden mit dem Klenow-Fragment

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes konnte bei dsDNA Strängen ein zurückversetztes 3'-Ende mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 9 U Klenow Fragment (GibcoBRL), 60 μ M dNTPs in 30 μ l durchgeführt. Nach 30 min bei 37°C in einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 50 μ g/ml BSA konnte die Reaktion durch die Inkubation für 10 min bei 70°C beendet werden.

3.9.3 DNA-Ligation

(Dower et al., 1988)

Mit der T4-DNA-Ligase (4 U/ μ l) (Stratagene, Heidelberg) konnten Phosphodiesterbrücken zwischen zwei DNA-Molekülen mit einer 3'Hydroxy- und einer 5'Phosphatgruppe gebildet werden. Es empfahl sich bei der Ligation eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid ein molares Verhältnis von ca. 3:1 zu wählen. Die Ligationsreaktion erfolgte in 20 μ l mit Ligationspuffer 16 h bei 14°C im Wasserbad.

Vor einer anschließenden Elektroporation (3.3.2) musste der Ligationansatz entsalzt werden. Dazu wurde eine Phenol-Choroform-Extraktion (3.7) durchgeführt und die DNA wurde mit Hilfe von Polyacrylamid und Natriumacetat (3.4) gefällt. Die getrocknete DNA wurde in Wasser aufgenommen.

Ligationspuffer: 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 66 mM Tris/HCl (pH 7.5)

3.9.4 Radioaktive Markierung

Für die radioaktive Markierung von DNA mit ³²P zum Einsatz als Sonde für die Northern-Hybridisierung wurde das RADPrime DNA Labeling System benutzt (GibcoBRL10555808). Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt. Dabei wurden die DNA-Sonden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes mit α -³²P-dATP markiert. Zuvor mussten 1-5 μ g der DNA für 5 min bei 100 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt werden. Die denaturierte (einzelnsträngige) DNA wurde nun nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des Klenow-Fragmentes, α -³²P-dATP, dCTP, dGTP und dTTP *in vitro* transkribiert. Durch die Zugabe von EDTA nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Nach 5 min Denaturierung bei 100° C und anschließend sofortiger Abkühlung auf Eis war die Sonden-Lösung direkt einsatzbereit für die Northern-Hybridisierung (3.19).

3.10 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich in einem elektrischen Feld auf die Anode zu. Die linearisierten Nukleinsäuremoleküle trennen sich dabei im Gel nach ihrer Größe und Konformation auf.

Es wurden 1%ige Agarosegele in 1 x TAE-Puffer (50 ml) verwendet, die 0,1 µg Ethidiumbromid / ml enthielten. Ethidiumbromid interkalierte in die Nukleinsäuren und fluoreszierte nach UV-Lichtanregung. Nukleinsäuren konnten so auf einem Transilluminator (UVP._{INC}, San Gabriel, USA) im Gel sichtbar gemacht werden. Die DNA-Proben wurden zu Beginn mit Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 bis 8 V/cm in TAE-Puffer. Als DNA-Längenmarker wurden 500 ng einer 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

TAE-Puffer: 40 mM Tris / Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0

Probenpuffer (5 x): 30 % (v/v) Glycerin, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau,
0.25 % (w/v) Xylencyanol in TAE-Puffer

3.11 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente bekannter Basenlänge aus einem Gemisch verschiedener DNA-Stränge wurde die Probe elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt (3.10). Unter UV-Licht-Anregung auf einem Transilluminator wurde die gewünschte DNA-Bande knapp ausgeschnitten. Für die Extraktion der DNA aus dem Agaroseblock wurde das DNA Purifikation Kit „Easy Pure“ (Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) verwendet. Das Protokoll und die Lösungen des Herstellers wurden verwendet. Die Gelbande wurde in 3 Volumen SALT-Lösung bei 55°C gelöst. Durch die Zugabe der BIND-Lösung (5 µl plus je 1 µl pro erwartete 1 µg DNA-Ausbeute) wurde die DNA an die Partikel der BIND-Suspension gebunden. Nach 5 min wurde die gebundene DNA herunter zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml WASH-Lösung resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Sediment in 10 µl Wasser resuspendiert. Dabei ging die DNA in Lösung und konnte mit dem Überstand abgenommen werden.

3.12 Ligation des pRS1-Gens in den pRc/CMV-Vektor

Für die Expression des pRS1-Proteins in Eukaryontenzellen musste das pRS1-Gen aus dem Plasmid pBS/pRS1 (Spangenberg, 1993) in den pRc/CMV Vektor (Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert werden. Durch die Restriktion mit Bgl II und Hind III konnte ein ca. 2,2 kb großes Fragment erhalten werden, welches den gesamten Leseraster des pRS1 enthielt. Mit dem Klenow-Fragment (3.9.2) wurden die überstehenden Enden aufgefüllt, so dass anschließend eine Ligation (3.9.3) mit BstX I Adaptoren durchgeführt werden konnte. Das isolierte 2,2 kb Fragment wurde anschließend mit dem restringierten pRc/CMV/BstX I- Vektor ligiert (3.9.3). Die richtige Orientierung wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft und die Erhaltung des Leserasters wurde durch die Sequenzierung des gereinigten Plasmids bestätigt.

3.13 Trunkierungen des pRS1-Gens

pEGFP-C1/pRS1(AS 1-364)

Das Plasmid pBS/pRS1 (Spangenberg,1993) diente als Ausgangsvektor zur Synthese des um 259 AS am C-Terminus verkürzten pRS1. Nach Restriktion mit Bgl II und BspH I konnte ein 1.1 kb pRS1 Gen-Fragment isoliert werden, welches mit Nco I / Hind III Adaptoren ligiert wurde. Nach Restriktion des Ligationsproduktes mit Bgl II und Hind III konnte das pRS1-Genfragment in den ebenso geschnittenen pEGFP-C1 Vektor (Clontech) ligiert werden. Das GFP-pRS1 Fusionsprotein enthält die ersten 364 AS des pRS1.

pEGFP-C1/pRS1(AS 1-581)

Aus dem Plasmid pBS/pRS1 Δ 100% (Baumgarten, 1999) wurde das Gen des am C-Terminus um 42 AS verkürzten pRS1 durch Restriktion mit Sac I und Kpn I gewonnen und in den ebenso restringierten pEGFP-C1 ligiert. Das GFP-pRS1 Fusionsprodukt beinhaltet das 581 AS lange pRS1.

pEGFP-C1/pRS1(AS 1-523)

Aus dem Plasmid pEGFP-C1/pRS1 (Baumgarten, 1999) wurde durch Xcm I und Sma I Verdau ein C-terminales 0.3 kb Fragment entfernt. Nach Religation konnte ein GFP-pRS1 Protein gewonnen werden, welchem am C-Terminus 100 AS fehlen.

pEGFP-C1/pRS1(AS 329-623)

Der Vektor pBS/pRS1 diente zur Herstellung eines N-terminal verkürzten pRS1, welchem die ersten 328 AS fehlten. Dazu wurde nach Sau3A Restriktion ein 1.2 kb DNA-Fragment des pRS1 Gens isoliert und mit pUCI9/Bam/CIP ligiert. pUCI9/RS1(AS 329-623) konnte nun mit EcoR I und Sal I restringiert werden, wobei anschließend ein 1.2 kb Fragment isoliert werden musste, welches in den ebenso geschnittenen pEGFP-C1 Vektor ligiert wurde.

Der Erfolg der Ligationen und die Erhaltung des Leserasters wurden durch Sequenzierung der Plasmid-DNAs überprüft.

3.14 Expression des rekombinanten pRS1 in *E.coli*

Der *E.coli* Stamm BL21[DE3], der das Plasmid pET22b(+)pRS1 enthält, diente zur Expression des rekombinanten pRS1, welches am C-Terminus 6 zusätzliche Histidinreste trägt (Valentin et al., 2000). Eine Vorkultur (3.2.2) wurde in LB-Medium mit 100 µg Ampicillin pro ml über Nacht angezogen. Vier 1000 ml Erlenmeierkolben mit Schikanen wurden mit der Vorkultur 1 zu 100 inokuliert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.6 wurde Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0.4 mM zugegeben. IPTG ist ein nicht metabolisierbares Lactoseanalogon, welches die Synthese der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors aktiviert. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert das pRS1 Gen, womit die Proteinsynthese des rekombinanten RS1 eingeleitet werden konnte. Nach vier Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (2.000 g, 10 min, 4°C) und zur Aufreinigung des rekombinanten pRS1 eingesetzt (3.20).

3.15 RNA aus Zellkulturen

(Chomczynski et al., 1987)

RNA-Lösungen wurden stets mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Durch die Behandlung von Wasser mit 1/1000 Vol DEPC bei 37°C für 16 h wurden eventuell vorhandene RNAsen inaktiviert. Während der anschließenden Autoklavierung zersetzte sich das restliche DEPC.

Zur Isolierung von mRNA musste zuerst Gesamt-RNA aus den Zellen gewonnen werden. Für eine geplante Northern-Hybridisierung wurden mindestens 300 cm² konfluent gewachsene LLC-PK₁-Zellen benötigt. Nach Abnahme des Nährmediums wurden die Zellen in 1 ml

Denaturierungslösung pro 10^7 Zellen gelöst. Die denaturierten Zellen wurden in ein Corex Schraubgefäß überführt und mit einem 1/10 Volumen Natriumacetat (2 M, pH 4.0), plus 1 Volumen Phenol (wassergesättigt), plus 1/5 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1, v/v) ausgeschüttelt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde zur Phasentrennung eine Zentrifugation von 20 min bei 10.000 g und 4 °C (Sorvall, SS34, Bad Homburg) durchgeführt. Die wässrige Phase (oben) enthielt die RNA und wurde nach Abnahme zur Präzipitation mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 16 h bei -20°C konnte die ausgefallene RNA bei 4°C und 10000 g nach 10 min als Sediment erhalten werden, welches in 1 ml Denaturierungslösung gelöst und in ein 2 ml silanisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach der Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 2 h bei -20°C konnte durch Zentrifugation (s.o.) ein RNA-Pellet erhalten werden. Die RNA wurde mit 75 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert (s.o.). Nach Abnahme des Überstandes und Trocknung des RNA-Pellets wurde die RNA in DEPC-Wasser gelöst und bei -70 °C gelagert.

Denaturierungslsg.: 4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Na-Zitrat, 0.1 M β -Mercaptoethanol (frisch zugegeben), 0.5 % N-Laurosylsarcosin, pH 7.0

3.16 Poly(A)⁺-RNA

Es wurde das Oligotex mRNA Midikit (700 42) der Firma Qiagen verwendet und das Spin-Column Protokoll des Herstellers zur Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA (3.15) befolgt. Das Oligotex-Produkt der Firma Qiagen besteht aus Polystyren-Latex Partikeln (1.1 μ M Durchmesser) mit einer dT₃₀ Oligonukleotidoberfläche, welche die Poly(A)⁺Ketten der mRNAs spezifisch bindet.

Nach Zugabe des Bindungs-Puffers und der Oligotexsuspension wurde 3 min bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben. 10 min bei RT ermöglichten die Hybridisierung der Poly(A)⁺Bereiche der mRNAs mit den Oligotex-Partikeln. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Oligotex-Partikel mit Wasch-Puffer gevortext. Mit Hilfe einer durch Zentrifugation unterstützten Filtration konnte der Wasch-Puffer entfernt werden. Nach einem zweiten Waschschriff mit Wasch-Puffer wurde die mRNA mit Elutions-Puffer (70°C) eluiert. Die RNA Konzentration konnte photometrisch bestimmt werden (3.8).

3.17 Gelelektrophorese von RNA

(Gründemann und Koepsell, 1994)

Um eine genaue Auftrennung der RNA-Moleküle nach ihrer Größe zu ermöglichen, musste die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert werden. Deshalb wurde die RNA-Probe mit 3 Volumen RNA-Denaturierungslösung versetzt und 1 h bei 50 °C inkubiert. Dabei wurden die Guanidinreste mit Glyoxal so modifiziert, dass eine Renaturierung nicht mehr möglich war.

Zur Inhibierung von RNase-Aktivitäten wurde dem BES-gepufferten Agarosegel (3.11) 1 mg Jodacetat / ml zugefügt. Die Elektrophoresekammer wurde über Nacht mit einer H₂O₂-Lösung (3 %, v/v) inkubiert, um eventuelle RNasen zu inaktivieren. Die Auftrennung von je 5 µg mRNA pro Spur erfolgte bei 6 V / cm in BES-Puffer.

Bei Verwendung der Gele für einen Northern-Blot (3.18) wurde dem Gel kein Ethidiumbromid zugefügt. Der Mitlauf von 1.5 µg eines mit Ethidium-Bromid versetzten RNA-Größenstandards (GibcoBRL, Karlsruhe) ermöglichte, die Größe und Menge der RNA-Banden abzuschätzen.

BES-Puffer: 10 mM BES, 100 µM EDTA, pH 6.7

RNA-Denaturierungslösung: BES-Puffer, 66.6 % (v / v) DMSO, 1.33 M deionisiertes Glyoxal,

3.18 Northern-Transfer

Beim Northern-Transfer wurde mRNA, die zuvor in einem Agarosegel aufgetrennt worden war (3.17), auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Buchler, Braunschweig) übertragen. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel 45 min auf einen Taumelschüttler in 10 x SSC gewaschen. Die Überführung der RNA auf die Membran erfolgte nach dem Prinzip des Kapillarblottings. Durch den aufsteigenden 2 x SSC Puffer wurde die RNA vom Gel auf die Membran transferiert. Die Schichtung beim Blot war wie folgt:

```

-----Gewicht 500 g-----
-----
----- Stapel aus -----
----- saugfähigem Papier-----
-----
          3 Lagen
        Whatman 3M Papier
-----
Membran von Parafilm umhüllt
-----
          Agarose-Gel
-----
          3 Lagen
        Whatman 3M Papier
-----
Reservoir mit 2 x SSC

```

Der Transfer war nach 16 h beendet. Anschließend wurde die Blotmembran luftgetrocknet. Eine Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker, Stratagene, LaJolla, USA) führte zur kovalenten Bindung der RNA an die Membran. Nach 2 h trockener Hitze bei 80°C zur Entfernung des Glyoxals war die Membran für eine Northern-Hybridisierung (3.19) einsatzbereit.

20 x SSC: 3 M NaCl, 300 mM Natrium-Zitrat (pH 7.0)

3.19 Northern-Hybridisierung

Die Northern Hybridisierung diente zum Nachweis und Quantifizierung von spez. mRNAs.

Dazu wurden komplementäre DNA-Sequenzen, sogenannte DNA-Sonden, eingesetzt, die zuvor radioaktiv markiert worden waren (3.9.4).

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit den DNA-Sonden wurde eine Prähybridisierung der Blotmembran mit Heringssperm-DNA für 4 h bei 42 °C durchgeführt, um eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Blotmembran zu erreichen. Der Einsatz eines Hybridisierungsofens ermöglichte eine exakte Temperierung und gleichmäßige Benetzung der Membran mit der Hybridisierungslösung.

20 x SSPE: 3.6 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 8.0

50 x Denhard: 1 % (w/v) BSA, 1 % Ficoll, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon

Prä-Hybridisierungslsg.: 5 x SSPE, 50 % Formamid, 5 x Denhardt, 0.5 % (w/v) SDS,

20 µg frisch denaturierte Heringssperma-DNA / ml

(5 min bei 95°C und anschließend auf Eis)

Anschließend wurde die jeweils gewünschte markierte DNA-Sonde (3.9.4) 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, anschließend der Prähyridisierungslösung zugefügt und weitere 16 h bei 42 °C inkubiert.

Folgende DNA-Sonden wurden verwendet:

- Humane GPDH-Sonde: 1.1 kb Fragment (Clontech, Heidelberg)
- pSGLT1-Sonde: Nukleotide 1546 – 1818 (Ohta et al., 1990)
- pVasopressin Rezeptor-Sonde: Nukleotide 1 - 1494 (Gorboulev et al., 1993)

Waschen der Membran nach der Hybridisierung:

- 1) in 2 x SSPE / 0.1 % SDS, 15 min bei 42°C
- 2) in 1 x SSPE / 0.1 % SDS, 15 min bei 42°C
- 3) in 0.25 x SSPE / 0.1 % SDS, 15 min bei 50°C

Die gewaschene Membran wurde in Saran-Folie eingeschlagen und einem Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Signalintensität konnte nach wenigen Stunden bis einigen Tagen ein Signal durch die markierte hybridisierte Sonde erzielt werden.

Mit Hilfe der Dehybridisierungslösung konnte nach 2 Waschschrritten für je 1 h bei 65°C die hybridisierte Sonde wieder abgewaschen werden, so dass die Blotmembran für eine weitere Northern-Hybridisierungen zur Verfügung stand.

Dehybridisierungslösung: 5 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0.1 x Denhardt, pH 8.0

3.20 Aufreinigung des rekombinanten pRS1-Proteins

Die pelletierten *E.coli* Zellen (3.14) lagerten das überexprimierte rekombinanten pRS1 in Form von „Inclusion bodies“ in den Zellen ab.

Die Bakterienzellen wurden in 100 ml Beschallungspuffer suspendiert und bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension 5 min 400 Watt Ultraschall (Labsonic 1510, Braun, Hanau) ausgesetzt, wodurch sich die Viskosität der Zellsuspension deutlich reduzierte. Die ungelösten „Inclusion bodies“ wurden bei 10000 g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Nach Resuspension in 100 ml IB-Waschpuffer folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 20000 g für 10 min bei 4°C. Die sedimentierten „Inclusion bodies“ konnten nun in 40 ml IB-Aufschlusspuffer 1 h bei RT gelöst werden. Ungelöste Proteine wurden mit 25000g für 15 min bei 8°C abgetrennt.

Beschallungspuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 7.8

IB-Waschpuffer: 2 M Harnstoff, 0.1 Tris/HCl, pH 8.0

IB-Aufschlusspuffer: 8 M Harnstoff, 0.1 M β -Mercaptoethanol, 0.1 M Tris/HCl pH 8.0

Die sechs Histidinreste am C-Terminus des rekombinanten pRS1 ermöglichten die Aufreinigung über eine Ni^{2+} -NTA-Affinitätsmatrix (Qiagen, Hilden)

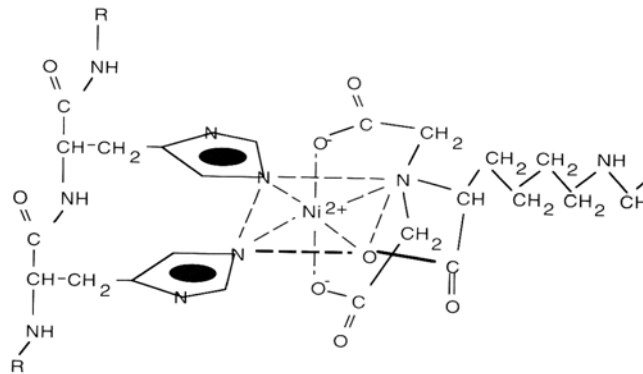


Abb. 3.1: Interaktion zwischen 6xHis Tag und Ni-NTA Rest (aus Qiagenhandbuch 1992)

10 ml der Ni^{2+} -NTA-Agarose wurden mit Bindungspuffer äquilibriert und mit 40 mg Protein der gelösten „Inclusion bodies“ 16 h bei 4°C auf einem Taumelschüttler inkubiert.

Die Nickelagarose wurde anschließend in eine Säule gegossen (Durchmesser 3 cm) und mit 200 ml Bindungspuffer gespült (1 ml/min). Nach Durchlauf von 10 ml Waschpuffer (0.1 ml/min) konnte das rekombinante pRS1 mit 30 ml Elutionspuffer (0.1 ml/min) eluiert werden.

Bindungspuffer: 3 M Harnstoff, 5 mM β -Mercaptoethanol, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0

Waschpuffer: Bindungspuffer plus 0.8 mM Imidazol

Elutionspuffer: Bindungspuffer plus 60 mM Imidazol

Die aufgefangenen 0.5 ml Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt anhand der Extinktion bei 280 nm analysiert. Fraktionen mit einer Extinktion größer als 0.5 wurden vereinigt und der exakte Proteingehalt konnte mit einer Proteinbestimmung nach Lowry (3.25) festgestellt werden.

Der Erfolg der Aufreinigung des rekombinanten pRS1 wurde abschließend im SDS-PAGE überprüft (3.26/27).

3.21 Antigene

Es wurden Antiseren gegen das rekombinante pRS1 und gegen eine Peptidsequenz (AS 518 – 535) aus dem pSGLT1 gewonnen (Ohta et al., 1990).

Das aus *E.coli* gewonnene rekombinante pRS1 (3.20) konnte aufgrund seiner Größe direkt für die Immunisierung eingesetzt werden.

Das Peptid aus dem pSGLT1 [EAPEETIEIEVP EEKKG C] (Synthese Prof. Palm, Universität-Würzburg) wurde zur Steigerung der Immunogenität an Ovalbumin (Sigma) gekoppelt.

Für die Kopplung wurden 9 mg Ovalbumin (1 mg/ml) in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8.0) gelöst. Sehr langsam wurde 1 ml einer MBS-Lösung zugetropft, wobei keine Trübung durch ausgefallenes Protein auftreten durfte. Die Lösung musste 30 min bei RT gerührt werden. Mit einer Gelfiltration über Sephadex G 25 (PG 10, Biorad) konnte nicht reagiertes MBS abgetrennt werden. Dabei wurde die Lösung in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.0) umpuffert. Das Peptid (1 mg/ml) wurde zwischenzeitlich in PBS (pH 7.2–7.4) gelöst und mit der Ovalbumin/MBS Lösung (unmittelbar vor dem Einsatz mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt) in gleichen Proteingewichtsanteilen gemischt. Nach 3 h bei RT war die Kopplung des Peptids über MBS an Ovalbumin beendet (Hartow and Lane, Antibodies, 1988).

MBS-Lsg: m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccimidester (M 8759, Sigma)

10 mg MBS/ml Dimethylformamid (DMF)

3.22 Gewinnung polyklonaler Antisera

Für die Immunisierung wurden ca. 6 Monate alte Kaninchen eingesetzt, denen vor Beginn des Immunisierungszyklus aus der Ohrarterie Blut zur Gewinnung von Präimmunsereen abgenommen wurde. Das Antigen (3.21) wurde in PBS gelöst und im Volumenverhältnis 4:1 mit PAO gründlich emulgiert. Bei der Erstimmunisierung wurde zusätzlich 100 µg Adjuvant Peptid (Muramyldipeptid, Sigma A9519) eingesetzt. Bei der ersten Immunisierung wurden 500 µg und für die 3 nachfolgenden Immunisierungen im Abstand von 21 Tagen wurden jeweils 250 µg des Antigens benötigt. Die Injektionen erfolgten subskapulär. 7 bis 10 Tage nach der letzten Boosterimmunisierung wurden dem Tier aus der Ohrarterie 20 ml Blut entnommen. Das Blut wurde nach 3 h bei RT und 16 h bei 4°C zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C) und als Überstand konnte das Antiserum erhalten werden. Das Serum wurde fraktioniert und gelagert bei –70°C und –196°C.

PAO: 4 ml Poly Alpha Olefine, 0.9 ml Tween-81, 0.3 ml Tween-80

3.23 Titerbestimmung

Die Bestimmung diente zur Beurteilung der Reaktivität des Antiserums gegen das Antigen.

Die Verdünnung des Antiserums, bei der eine halbmaximale Reaktionsstärke im ELISA erzielt werden konnte, wurde als Titer definiert.

- 1) Das Antigen (10 µg/ml) wurde in Natriumcarbonatpuffer (pH 9.5) gelöst und je 150 µl pro Vertiefung wurden zur Beschichtung einer 96Loch-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorp™ Surface, Dänemark) für 16 h bei 4°C eingesetzt.
- 2) Nach Entfernung des Beschichtungspuffers wurde die Mikrotiter-Platte mit 0,5 % BSA-Blockpuffer 2 h bei RT inkubiert.
- 3) Nun wurde die gesamte Platte drei mal für je 5 min in Waschpuffer inkubiert.
- 4) Eine Verdünnungsreihe des Serums in Blockpuffer wurde angelegt (empfehlenswert: von 1:400 bis 1: 204.800) und je 100 µl pro Vertiefung pipettiert. Inkubations: 16 h bei 4°C.
- 5) Waschen (siehe Punkt 3)
- 6) Ziege-anti-Kaninchen-F(ab')₂-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma, A-3937) wurde 1:250 im Blockpuffer verdünnt und davon je 100 µl pro Loch pipettiert. Inkubation: 4 h bei RT
- 7) Waschen (siehe Punkt 3)
- 8) Pro Vertiefung wurden 100 µl Äquilibrierungspuffer benötigt. Inkubation: 5 min bei RT
- 9) Der Äquilibrierungspuffer wurde durch je 100 µl Substratpuffer ersetzt.
- 10) Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl EDTA-Lösung (100 mM, pH 8.0) gestoppt.

Blockpuffer: 200 mM NaCl, 0.5 % BSA, 0.1% Natriumazid in PBS (pH 7.4)

Waschpuffer: 200 mM NaCl, 0.05 % Tween-20 in PBS (pH 7.4)

Substratpuffer: 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (frisch zugeben), 100 mM Tris/HCl pH 9.8

1 mg/ml Sigma 104 Substrat (Para-Nitrophenylphosphat)

Mit dem ELISA-Reader (Multiskan Plus, Titertek) wurden die Extinktionswerte bei 405 nm um die Extinktionen bei 450 nm korrigiert. Aus dem Abfall der Extinktionswerte bei Zunahme der Verdünnungsstufe konnte der Titer des Serums bestimmt werden.

3.24 Affinitätsreinigung der Antiseren

Die Reinigung der Antiseren an ihrem Antigen ermöglichte die Selektion der gewünschten Antikörper. Zwei unterschiedliche Verfahren wurden eingesetzt, die sich in der Präsentation des Antigens unterschieden. Das rekombinante pRS1 wurde an der Oberfläche von Polystyren-Mirotiterplatten immobilisiert, während die Peptide an Sepharose gekoppelt wurden.

Antikörper gegen das gesamte rekombinante pRS1:

- 1) Das rekombinante pRS1 (3.20) wurde in Natriumcarbonatpuffer (pH 9.5) [100 µg/ml] gelöst und je 200 µl pro Vertiefung in Reihe 1, 5 und 9 einer 96Loch-Mikrotiterplatte (Nunc-ImmunoTM Plate, MaxiSorpTM Surface, Dänemark) pipettiert. Inkubation: 16 h bei 4°C
- 2) Nach dem Entleeren der Platte wurden alle Vertiefungen mit je 200 µl Block-Lösung gefüllt. Inkubation: 1 h bei RT
- 3) 4 mal mit je 200 µl TBST-Puffer waschen
- 4) In Reihe 1, 5 und 9 werden pro Vertiefung 200 µl des 1:20 in Blocklösung verdünnten Vollserums zugegeben. Inkubation: 2 h bei RT
- 5) Nach Entfernung der Serumlösung wurden die Reihen 1, 5 und 9 gewaschen (Punkt 3)
- 6) In Reihe 2, 6 und 10 wurden pro Vertiefung je 200 µl Shiftpuffer (pH 8.8) vorgelegt.
- 7) Für 3 min wurde pro Loch in Reihe 1, 5 und 9 je 200 µl Elutionspuffer (pH 2.5) pipettiert und anschließend wurden die eluierten Antikörper im Elutionspuffer mit einer Mehrkanalpipette schnell in die Reihe 2, 6 und 10 zur Neutralisierung des pH-Wertes überführt.
- 8) Die Fraktionen wurden vereinigt, mit 0,02 % Thimerozal konserviert und bei 4°C gelagert.

TBST-Puffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, 50 mM Tris/HCl pH 8.0

Blocklösung: 0.5 % BSA in TBST-Puffer

Shiftpuffer: 50 % der Blocklösung und 50 % Tris/HCl pH 8.8

Elutionspuffer: 0.1 M Zitronensäure, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 2.5

Die Affinitätsreinigung des anti-RS1 Serum in den Mikrotiterplatten verursachte einen ca. 70%igen Verlust im Vergleich zum Titer des Vollserums.

Peptid-Antikörper:

Antikörper gegen die Peptidsequenzen aus mSGLT1 [KDTIEIDTEAPQKKKGC] und pSGLT1 (AS 518-535) wurden durch Affinitätsreinigung an peptidgekoppelte Sepharose gewonnen.

- 1) 200 mg Epoxy-Sepharose (E6754, Sigma) wurde 30 min in 20 ml PBS gequollen und anschließend auf einer Glasfritte mit Wasser gewaschen.
- 2) Die Sepharose wurde in 5 ml 0,2 M Natriumcarbonat (pH 10.5) aufgenommen und 100 µg des Peptids wurden zugefügt. Inkubation: 16 h bei 37°C auf einer Schüttelmaschine
- 3) Durch die Zugabe von 10 ml 0,1 M Ethanolamin/HCl (pH 10.0) wurden die noch freien Oxirangruppen abgesättigt. Inkubation: 16 h bei 37°C auf einer Schüttelmaschine
- 4) Die peptidgekoppelte Sepharose wurde nun mit Blockpuffer auf einer Glasfritte gewaschen und in 4,5 ml Blockpuffer aufgenommen. Es folgte eine Zugabe von 450 µl des Vollserums. Inkubation: 16 h bei 4°C auf einem Schüttler
- 5) Die gekoppelte Sepharose wurde in eine kleine Säule (z.B. mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette) überführt und mit 50 ml PBS gewaschen.
- 6) Nach Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (pH 2.5) wurde das Eluat in Fraktionen von ca. 200 µl aufgefangen, wobei das Eluat direkt in 160 µl Shiftpuffer (pH 8.8) tropfte.

Blockpuffer: 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 7.5, 1% BSA, 0.1 % (v/v) Tween-20

Shiftpuffer: ½ Vol Blocklösung und ½ Vol 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

Elutionspuffer: 100 mM NaCl, 100 mM Zitronensäure, pH 2.5

Die gewonnenen Fraktionen wurden im ELISA (3.23) auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern getestet. Der Titer verringerte sich im Vergleich zum Vollserum meist nur sehr geringfügig.

3.25 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgte je nach Anforderung nach Bradford (1976) oder Lowry (1951). Als Vergleichsstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet.

Bradford (1976):

Die Blaufärbung der Nachweislösung durch Proteine basiert auf der Reaktion des Coomassie Brilliant Blue G-250 mit basischen und aromatischen Aminosäuren. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde aufgrund der einfachen Handhabung bevorzugt eingesetzt.

100 µl der Proteinlösung (bis ~0,1 µg/µl) wurden mit 1000 µl Bradford-Reagenz (Biorad, München) versetzt und 5 bis 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und um den Extinktionswert des Leerwertes (Puffer-Lösung) korrigiert.

Lowry et al. (1951):

Die Entwicklung einer Gelbfärbung beim Proteinnachweis basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} unter alkalischen Bedingungen mit Peptidbindungen und Tyrosinresten komplexiert und der anschließenden Reduktion eines Folin Phenol Reagenzes. Aufgrund der Empfindlichkeit des Nachweises gegenüber vielen Puffersubstanzen wird zu Beginn eine Proteinfällung durchgeführt.

- 1) Der Proteinlösung (50 µl) wurde 1 ml einer 10 % (w/v) Trichloracetatlösung (TCA) zugegeben. Nach 30 min auf Eis konnte das ausgefallene Protein bei 10.000 g nach 10 min als Sediment erhalten werden.
- 2) Das Proteinsediment wurde in 100 µl 1M NaOH, 1% (w/v) SDS gelöst. Inkubation: 10 min bei 37°C
- 3) Zugabe von 1 ml Biuret-Reagenz [0,04 % (w/v) $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Tartrat; 0,02% (w/v) CuSO_4 in 2,5%igem (w/v) NaCO_3]. Inkubation: 10 min bei RT
- 4) Zugabe von 100 µl Folin-Ciocalteu-Phenol-Lösung (Merck, Darmstadt) und mischen
- 5) Nach 30 min bei 37°C konnte die Extinktion der Probe bei 750 nm gemessen werden.

3.26 SDS-PAGE

(Laemmli, 1970)

Eine wichtige Voraussetzung für die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im Polyacrylamidgel (PAA-Gel) ist die Denaturierung und gleichmäßige Solubilisierung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS).

Denaturierung der Proben:

Die Proben wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit Probenpuffer (2x) bei 37°C für 45-60 min inkubiert. Durch die Verwendung eines Phosphatpuffers anstelle eines Tris-Puffers konnte die Gefahr einer Spaltung von Asp-Pro-Peptidbindungen während der Denaturierung unterbunden werden (Kowit and Maloney, 1982)

Probenpuffer (2x): 0.5 M β -Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol,
0.001 % (w/v) Bromphenolblau, 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.8

Die Reduktion der Proteine durch β -Mercaptoethanol konnte durch eine anschließende Alkylierung irreversibel gemacht werden. Dazu wurde 1/10 Volumen einer Jodacetamidlösung (20 % w/v) der Proteinprobe nach der Denaturierung im Probenpuffer (pH 8.0) zugefügt und weitere 20 min bei 37°C inkubiert (Westermeier, 1997).

Elektrophorese:

Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems mit einem Fokussierungs- (pH 6.8) und einem Trenngel (pH 8.8) erlaubte eine optimale Trennschärfe der Proteine im PAA-Gel. Es wurde eine vertikale Elektrophorese-Kammer (Biometra) verwendet mit einer Gelgröße von 80 x 85 x 0,8 mm. Die Spannung für die Fokussierung betrug 80 V und für die Trennung 120 V.

Trenngel: 8 % PAA, 0.1 % (w/v) SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8.8

Fokussierungsgel: 5 % PAA, 0.1 % (w/v) SDS, 125 mM Tris/HCl pH 6.8

Die Polymerisierung der Gele wurde durch die Zugabe von 50 μ l Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) und 5 μ l Tetramethylethyldiamin gestartet.

Elektrophoresepuffer: 24.8 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

3.27 Silber-Färbung von PAA-Gelen

(Nesterenko et al., 1994)

Diese Schnellfärbe-Methode von Proteinen im PAA-Gel besitzt eine Proteinnachweisgrenze von 0,02 μ g pro Bande und kann in 30 min durchgeführt werden.

1) Fixierung:	60 ml 50%ige (w/v) Acetonlsg. + 1,5 ml TCA-Lsg. (50 % w/v) + 25 µl 37 %ige (w/v) Formaldehydlsg.	5 min
2) Spülen:	60 ml H ₂ O	3 x 5 sec
3) Waschen:	60 ml H ₂ O	5 min
4) Spülen:	60 ml H ₂ O	3 x 5 sec
5) Vorbehandlung:	60 ml 50%ige (w/v) Acetonlsg.	5 min
6) Vorbehandlung:	100 µl 10 %ige (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ -Lsg. + 60 ml H ₂ O	1 min
7) Spülen:	60 ml H ₂ O	3 x 5 sec
8) Imprägnieren:	0,8 ml 20 %ige (w/v) Silbernitratlsg. + 0,6 ml 37 %ige (w/v) Formaldehydlsg. ad 60 ml H ₂ O	8 min
9) Spülen:	60 ml H ₂ O	2 x 5 sec
10) Entwickeln:	1,2 g Na ₂ CO ₂ + 25 µl 37 %ige (w/v) Formaldehydlsg. ad 60 ml H ₂ O	45– 60 sec
11) Stoppen:	60 ml 1%ige (v/v) Essigsäure	3 min

Das gefärbte PAA-Gel konnte getrocknet oder für 3 bis 6 Monate in Wasser gelagert werden.

3.28 Westernblot

Eine Detektion von bestimmten Proteinen mit Antisera ist im PAA-Gel nicht direkt möglich. Deshalb mussten die Proteine zuerst aus dem PAA-Gel elektrophoretisch auf eine proteinbindende Membran übertragen werden.

Semi-dry Blot:

(Kyhse and Anderson, 1984)

Es wurde eine horizontale Blot-Apparatur (Novablot, Pharmacia, Freiburg) mit zwei Graphitplatten verwendet. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Proteine in Richtung der Anode und werden dabei von der Nitrozellulosemembran gebunden und immobilisiert. Die Schichtung zwischen den Graphit-Elektroden war wie folgt:

Kathode (-)
 Graphitplatte
 3 Lagen Whatman Papier (3M)
PAA-Trenngel
Membran aus Nitrozellulose
 3 Lagen Whatman Papier (3M)
 Graphitplatte
Anode (+)

Die Blotmembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) und die Whatman-Papiere wurden zuvor in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol, pH 8.3) getränkt, um einen Stromfluss zu ermöglichen. Der Blot konnte bei einer konstanten Stromstärke von 1.3 mA/cm^2 nach 120 min beendet werden.

Ponceau-S-Färbung:

(Salinovich and Montelaro, 1986)

Die Übertragung der Proteine vom PAA-Gel auf die Nitrozellulose-Membran konnte durch eine Proteinfärbung kontrolliert und beurteilt werden.

Dazu wurde die Membran für 3 min in einer Ponceau-S-Lösung [1 % (w/v) Ponceau-S, 3 % (v/v) TCA] geschwenkt. Anschließend konnte die Membran durch Waschen mit H₂O bis zum Erkennen der Proteinbanden entfärbt werden. Bei weiterem Waschen mit H₂O wurden auch die Proteinbanden auf der Membran wieder entfärbt.

Proteindetektion mit Antisera:

Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Rotationsschüttler durchgeführt.

- 1) Blockierung der Membran mit 2% (w/v) Magermilchpulver (Fluka) in TBST Puffer.
Inkubation: 1 h bei RT
- 2) Austausch der Blocklsg. gegen die 1. Antikörperlsg. in Blocklsg. Inkubation: 16 h, 4°C
- 3) Waschen der Membran in Blocklsg. Inkubation: 3 x 15 min bei RT
- 4) Der sek. Antikörper (Ziege anti-Kaninchen-IgG-POX-Konjugat, Sigma A-0545) wurde 1:5.000 in Blocklsg. verdünnt und mit der Blotmembran inkubiert: 1 h bei 4°C.
- 5) Waschen der Membran in Blocklsg. Inkubation: 3 x 15 min bei RT
- 6) Inkubation der Blotmembran mit 2 ml Enhanced chemoluminescence-Reagenz (Amersham) für 1 min bei RT
- 7) Nach dem Abtropfen der Membran wurde die Membran in Saran-Folie eingeschlagen und einem Röntgenfilm aufgelegt (bis 30 min).
- 8) Entwicklung des Röntgenfilms

TBST-Puffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, 50 mM Tris/HCl pH 8.0

3.29 Zellfraktionierung

Die Degradierung von Proteinen durch Proteasen während der Aufarbeitung konnte durch die anfängliche Zugabe von Protease-Inhibitoren und die Durchführung bei 4°C bzw. Lagerung auf Eis eingeschränkt werden.

Zur Inhibition von Proteasen:

Protease-Inhibitor Stammlsg.(100x): 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1mM Benzamidin und 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Lösung (100x)

Gewebe:

(Rickwood, 1984)

Die in flüssigem N₂ schockgefrorenen Nieren von Mäuse wurden mit dem Mörser fein zerrieben und in 1 ml Saccharose-Puffer (inklusive Protease-Inhibitormix und PMSF) pro 100 mg Gewebe aufgenommen und anschließend mit einem Potter homogenisiert.

Bei einer Zentrifugation (150 g, 10 min, 4°C) konnten die noch nicht homogenisierten Zellen pelletiert werden. Aus dem Überstand konnten bei 2.000g für 10 min bei 4°C die Zellkerne und Mitochondrien sedimentiert werden. Eine Zentrifugation mit 40.000 g für 60 min ergab im Sediment eine mit Plasmamembranen angereicherte Fraktion.

Die erhaltenen Membranen wurden in einem angemessenen Volumen Saccharose-Puffer suspendiert und bei -70°C gelagert.

Saccharose-Puffer: 280 mM Saccharose, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 20 mM Tris/HCl pH 7.5

Bürstensaummembranvesikel aus der Schweineniere:

(Koepsell und Seibicke, 1990)

Aus den längshalbierten Nieren wurden die Rinde und die äußere Schicht der Medulla gewonnen und anschließend in 9 ml Homogenisierungspuffer pro g im Messerhomogenisator 5 min fein zerkleinert. Nach tropfenweiser Zugabe von 1M CaCl₂-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10 mM musste die Suspension 15 min inkubieren.

Bei 1.750 g für 12 min (4°C) wurden die Zelltrümmer sedimentiert und aus dem Überstand konnten bei 8.000 g nach 12 min (4°C) die Zellmembranen pelletiert werden, die in 1/10 ihres Ausgangsvolumen in Homogenisierungspuffer resuspendiert wurden. Nach wiederholter Anhebung der Kalziumkonzentration auf 10 mM und 15 min Inkubation wurde zentrifugiert

(3.500 g, 12 min, 4°C). Der Überstand wurde zentrifugiert bei 20.000 g für 12 min (4°C). Die sedimentierten Membranen wurden in 1/100 des Ausgangsvolumen in Tra-Puffer aufgenommen. Nach 20 min bei 48.000 g für 20 min (4°C) konnten die Bürstensaummembran-Vesikel (BBM-V) als Sediment erhalten werden. Die BBM-Vesikel wurden in wenig Tra-Puffer suspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Alle Puffer enthielten den Proteaseinhibitormix (1x) und 0,1 mM Diisopropylfluorophosphat
Homogenisierungspuffer: 10 mM Mannit, 2 mM Tris/HCl pH 7.1

Tra-Puffer: 10 mM Triethanolamin/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA,
10 % (v/v) Glycerol, pH 7.4

Bürstensaummembranvesikel aus dem Duodenum:

(Shirazi-Beechey et al., 1988)

Zur Isolierung von BBM-Vesikeln wurden 20 bis 30 cm des Darms (beginnend vom Magen an) abgetrennt und in Ringerlösung (4°C) gewaschen. Nachdem der Darm der Länge nach aufgetrennt worden war, wurde die Mucosa mit einem Objektträger abgeschabt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die schockgefrorene Mucosa wurde in 10 ml 100 mM Mannitol, 1 mM HEPES, pH 7.1 pro g Mucosa in einem Messerhomogenisator für 30 sec homogenisiert. Durch die tropfenweise Zugabe von 1 M MgCl₂ wurde die Magnesium-Konzentration auf 10 mM eingestellt. Nach 10 min Rühren wurde für 15 min bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert und aus dem Überstand wurden die Membranen sedimentiert bei 30.000 g für 30 min bei 4°C. Das Pellet wurde in 100 mM Manitol, 1 mM HEPES-Tris pH 7.4 suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Bürstensaummembranvesikel pelletiert. Die Vesikel wurden in 300 mM Mannitol, 1 mM MgSO₄, 20 mM HEPES-Tris pH 7.4 homogenisiert, portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ringerlösung.: 146 mM NaCl, 5.4 mM CaCl₂, 4 mM KCl

Alle verwendeten Puffer enthielten den Proteaseinhibitormix (1x) und 0.1 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP)

Zellkultur:

(modifizierte Methode nach Salehzada et al., 1991)

Für die Zellfraktionierung wurden etwa 5 Schalen (15 cm Durchmesser) konfluent gewachsener Zellkulturen verwendet.

- 1) Die Zellen wurden in der Kulturschale 2 mal mit PBS-Puffer (4°C) vorsichtig überspült.
- 2) Nach Zugabe von 3 ml des Puffers A (4°C) [inklusive der Protease-Inhibitoren] pro Schale (auf Eis) wurden die Zellen abgeschabt und die Zellsuspension musste für ca. 30 min im hypotonen Medium des Puffers A bei 4°C inkubieren.
- 3) Nach dem Schwellen wurden die Zellen 3 mal in flüssigem N₂ eingefroren und wieder aufgetaut.
- 4) Der Zellaufschluss wurde durch das wiederholte Scheren der Zellen beim Aufziehen und Ausdrücken durch eine feine Injektionskanüle und ein abschließendes Pottern beendet.
- 5) Nach Zentrifugation mit 1.200 g (5 min, 4°C) konnten im Sediment die Zellkerne angereichert werden.
- 6) Das Zellkernsediment wurde in Puffer A mit 0.5 % (v/v) Igepal (früher als Nonidet P-40 bezeichnet, Sigma) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Verdünnen der Igepalkonzentration mit Puffer A auf 0.1 % (v/v) konnte durch einen Zentrifugationsschritt mit 1.200 g (5 min, 4°C) eine angereicherte Fraktion von gewaschenen Zellkernen als Pellet erhalten werden.
- 7) Der Überstand (Punkt 5) wurde erneut zentrifugiert bei 40.000 g (1 h, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit Puffer A gewaschen (1.200 g) und abschließend konnte mit 40.000 g eine angereicherte Fraktion von Plasmamembranen sedimentiert werden.
- 8) Der erste 40.000 g Überstand (Punkt 7) konnte durch eine Ultrazentrifugation bei 200.000 g (2 h, 4°C) in eine angereicherte Zytoplasmafraktion (Überstand) und eine angereicherte Endomembranfraktion (Pellet) getrennt werden.

Puffer A: 10 mM Kaliumacetat, 15 mM Mg-Acetat, 1mM DTT, 20 mM HEPES pH 7.5

3.30 *In vitro* Phosphorylierung

Das rekombinante pRS1-Protein (3.20) wurde über Centricon-30 (Amicon) in Kinase-Puffer umgepuffert, um den enthaltenen Harnstoff und β -Mercaptoethanol (vom NTA-Elutionspuffer) zu entfernen und anschließend ca. 2 h bei 4°C inkubiert.

Kinase-Puffer: 50 mM Tris/HCL pH 6.8, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM DTT

Phosphorylierung mit Proteinkinase A (PKA):

Der Phosphorylierungsansatz (200 μ l) enthielt:

- rekombinantes pRS1 bzw. dephosphoryliertes Casein (0,5 mg/ml)
- PKA (40 μ g/ml) [aus Rinderherz, Sigma]
- 50 μ M ATP
- 30 μ Ci γ -³²P ATP (1000 Ci/ mmol)
- 10 μ M cAMP
- Kinase-Puffer

Die PKA wurde durch 10 μ M cAMP aktiviert. Außerdem wurde eine Kontrollreaktion ohne cAMP durchgeführt.

Phosphorylierung mit Proteinkinase C (PKC):

Der Phosphorylierungsansatz (200 μ l) enthielt:

- rekombinantes pRS1 bzw. Histon H1 (0.5 mg/ml)
- PKC (0,175 Units) [aus Rattenhirn, Calbiochem]
- 50 μ M ATP
- 30 μ Ci γ -³²P ATP (1000 Ci/mmol)
- 2 mM CaCl₂
- 33.5 μ g/ml Phosphatidylserin
- Kinase-Puffer

Die PKC wurde durch die Zugabe von CaCl₂ und Phosphatidylserin aktiviert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne CaCl₂ und Phosphatidylserin aber mit 150 μ M EGTA durchgeführt.

Die Phosphorylierungsreaktionen wurden jeweils nach 30 min bei 30°C im Wasserbad durch die Zugabe von 0,075 Volumen einer 100 % (w/v) TCA-Lösung gestoppt und zur Fällung 30 min auf Eis inkubiert.

Das Proteinpellet (10.000 g, 3 min) wurde in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 100°C denaturiert. Nach der Auftrennung im SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und einem Röntgenfilm (Kodak, X-OMAT DS) exponiert.

3.31 Ubiquitin-Affinitätschromatographie

- 1) Die Zellen bzw. die BBM-Vesikel wurden in Lysispuffer (25 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% (v/v) Igepal, 1 mM PMSF, 1x Proteaseinhibitormix) bei 4°C 15 min solubilisiert und anschließend zentrifugiert (6.000 g, 10 min, 4°C).
- 2) Der Überstand wurde für 1 h mit äquilibrierten Anionenaustauscher DEAE52 (Whatman) bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert.
- 3) Nach der Sedimentation des Anionenaustauschers (DEAE52) wurde der Überstand entfernt und der Anionenaustauscher 3 mal mit 3 Vol Wasch-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl) kurz inkubiert.
- 4) Der Anionenaustauscher wurde in Elutionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 500 mM KCl) suspendiert. Inkubation: 10 min 4°C
- 5) Nach dem Absetzen des Anionenaustauschers wurde der Überstand (DE52-Eluat) mit Tris-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.5) im Volumenverhältnis 1:4 verdünnt und anschließend mit äquilibrierter Ubiquitin-Agarose (Calbiochem) inkubiert: 2 h bei 4°C auf einem Rotationsschüttler
- 6) Nach der Sedimentation der Ubiquitin-Agarose (4.000 g, 20 sec) konnte der Überstand abgenommen werden. Die Agarose wurde anschließend 3 mal in 10 Vol Wasch-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl) suspendiert.
- 7) Die Elution von der Ubiquitin-Agarose erfolgte durch die Zugabe von Laemmli-Proben-Puffer (3.26). Denaturierung: 45-60 min bei 37°C

Zur Überprüfung der Spezifität der Interaktion mit der Ubiquitin-Agarose wurde dem DEAE25-Eluat bei Schritt 5 lösliches bovines Ubiquitin (Sigma) in einer Endkonzentration von 250 µM zugefügt.

3.32 Zellkultur

LLC-PK₁- und HEK-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Als Nährmedium diente Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM, Sigma] mit 4 mM L-Glutamin (Sigma), 10 % (v/v) fetales Rinderserum (FCS, Sigma, Deisenhofen) und 100 U Penicillin/ml + 0,1 mg Streptomycin/ml. Das Medium wurde jeden 3. bzw. 4. Tag erneuert. Die Zellen wuchsen bei 37°C in einer H₂O gesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂.

3.32a Passage

Für eine schnelle Vermehrung wuchsen die Zellen bis zur Ausbildung eines zu 80 % geschlossenen Monolayers und wurden dann auf neue Kulturschalen verteilt. Die adhärenen HEK-Zellen ließen sich durch den leichten Druck des Pipettenstrahles vom Untergrund ablösen und gleichzeitig beim pipettieren vereinzeln. Die LLC-PK₁-Zellen lösten sich nach ca. 30 min Wirkung einer EDTA-Lösung (Kimmich et. al., 1994) vom Schalenboden. Nach vorsichtiger Suspension der Zellen mit einer Pipette wurden die Zellen sedimentiert (250 g, 10 min). Die Zellen wurden dann in Nährmedium resuspendiert und etwa im Verhältnis 1 zu 4 zum Ausgangsvolumen verdünnt.

EDTA-Lsg.: D-PBS (Sigma), 28 mM NaHCO₃, 0.02% (w/v) EDTA, 10 mM HEPES pH 7.4

3.32b Kryokultur

Zur Sicherung und Langzeitlagerung von Zelllinien wurde eine subkonfluente Zellkultur benötigt. Die abgelösten und sedimentierten Zellen (3.32a) wurden in einer Dichte von 10⁶ Zellen pro ml Kryomedium resuspendiert und sofort bei -20°C eingefroren. Nach 16 bis 24 h wurden die Zellen bei -70°C gelagert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen dann in -196°C (Stickstoff) überführt.

Kryomedium: DMEM-Komplettmedium mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid

Bei der Wiederaktivierung der Zellen musste die zellschädigende Wirkung des Dimethylsulfoxids (DMSO) möglichst gering gehalten werden. Deshalb wurde die Kryokultur bei 37°C im Wasserbad rasch aufgetaut, dann in 5 Volumen DMEM-Komplettmedium resuspendiert und sofort wieder sedimentiert (250 g, 10 min). Die Zellen wurden wiederum in DMEM-Komplettmedium resuspendiert und in einer Kulturschale ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen (etwa 16 h) wurde der erste Medienwechsel vorgenommen, um die letzten Spuren des DMSO zu entfernen.

3.33 *In vivo* Phosphorylierung

- 1) Die GFP-pRS1 stabil exprimierenden Zellen (Klon 4, Baumgarten 1999) erhielten nach Erreichen der Konfluenz (Petrischale: 10 cm Durchmesser) für 16 h 1 mCi ³²Phosphat.
- 2) Nach Abnahme und Entsorgung des radioaktiven Mediums wurden die Zellen 3 mal mit 5 ml kaltem PBS vorsichtig überspült.
- 3) Die Zellen wurden in 3 ml Lysis-Puffer (HMC-Puffer plus 50 mM NaF, 1 % (v/v) CHAPS, Proteasen-Inhibitor-Mix und 1mM PMSF) aufgenommen, gelöst und 20 min auf Eis inkubiert.
- 4) Nach einer Zentrifugation bei 12.000 g für 5 min wurde der Überstand mit 100 µl einer 10 % *Staphylococcus aureus* Zelltrümmersuspension (Pansorbin Cells, Calbiochem, Bad Soden) 30 min bei 4°C inkubiert.
- 5) Der Überstand einer Zentrifugation mit 18.000 g für 1 min wurde mit 5 µl des polyklonalen anti-GFP Serums (IgG Fraction, 8363-1, Clontech, Heidelberg) versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert.
- 6) Nach Zugabe von 40 µl in HMC-Puffer äquilibrierte Protein A CL-4B Sepharose (Pharmacia) wurde weiter für 16 h bei 4°C inkubiert.
- 7) Bei 1.000 g (1 min) wurde die Protein A Sepharose sedimentiert und anschließend 3 mal in 1 ml Lysispuffer gewaschen.
- 8) Nach Abnahme der Waschlösung wurde die Protein A Sepharose in 50 µl SDS-PAGE Probenpuffer suspendiert und 45-60 min bei 37°C inkubiert.
- 9) Der Überstand einer Zentrifugation nach 18.000 g (1 min) wurde im SDS-PAGE aufgetrennt und das getrocknete Polyacrylamid-Gel wurde autoradiographisch analysiert.

HMC-Puffer: 100 mM HEPES, 30 mM Mannitol, 10 mM CaCl₂, pH 7.4

3.34 Transfektionen von Zellen

Die Einschleusung von Fremd-DNA (3.12/13) in LLC-PK₁ bzw. HEK Zellen diente der Expression, Lokalisierung und Funktionsanalyse des RS1-Proteins.

3.34a Transiente Expression

Zu 290 µl serumfreiem DMEM wurden 9 µl FuGeneTM6 Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die

Transfektionslösung vorsichtig zu 6 µg der DNA Lösung (ca. 1 µg/µl) pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Direkt nach dem Austausch des Nährmediums von subkonfluenten Zellen (in Petrischale mit 10 cm Durchmesser) konnte die Transfektionslösung zupipettiert werden. Nach 24 bis 48 h wurde die Expression überprüft.

3.34b Stabile Expression

Nach der Transfektion wurden durch den Einsatz eines Antibiotikums (G-418) die erfolgreich transfizierten Zellen anhand der Resistenz (neo^R-Gen: Aminoglycosid-Acetyltransferase) selektiert und später vereinzelt.

10 µl des Lipofektinamin-Reagenzes (GibcoBRL, Karlsruhe) wurden mit 230 µl serumfreien DMEM gemischt. Gleichzeitig wurden 230 µl serumfreies DMEM mit 5 µg der Plasmid-DNA versetzt. Beide Lösungen wurden nun vorsichtig zusammenpipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Dabei konnte sich der gewünschte Lipid-DNA-Komplex für die Fusion mit den Zellen bilden. Nach dem Auffüllen mit serumfreiem DMEM auf 5 ml konnten die zu 50 % konfluenten Zellen (Petrischalen-Durchmesser: 10 cm) mit der Lösung bedeckt werden.

- a) Nach 16 h im Brutschrank wurde die Transfektionslösung durch Komplettmedium ausgetauscht.
- b) Nach 2 weiteren Tagen begann die Selektion durch den Einsatz von 0,2 g Geneticin [G 418] (Calbiochem, Bad Soden) pro ml Komplettmedium.
- c) Nach 8 weiteren Tagen wurde die Geneticinkonzentration auf 0,4 g/ml erhöht.
- d) Nach weiteren 8 Tagen wurde die Geneticinkonzentration auf 0,8 g/ml erhöht.
- e) Innerhalb der nächsten 2 bis 4 Wochen traten kleinere alleinstehende Zellinseln auf, die einzeln isoliert und bei 0,6 g Geneticin /ml vermehrt wurden.
- f) Die gewonnenen Zellklone wurden in Form von Kryokulturen (3.32b) gesichert.

3.35 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie (Axiophot 2, Zeiss, Jena) wurde zur Lokalisierung der GFP-pRS1 Fusionsproteine und zur Analyse der Aufnahme des Endozytosefarbstoffes RH 414 eingesetzt. Als Filmmaterial wurde ein SW-Film (Kodak, Tmax-400 professional) verwendet.

3.35a Grün fluoreszierendes Protein

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die LLC-PK₁ Zellen auf einen 8-Loch-Objektträger passagiert und bei Erreichen einer 50%igen Konfluenz mit den pEGFP-pRS1 Vektoren (3.13) transient transfiziert (3.34a).

24 bis 48 h nach der Transfektion wurde der Objektträger mit den Zellen kurz in PBS Puffer geschwenkt und nach Auflegen eines Deckglases sofort betrachtet.

Zur Konservierung der Fluoreszenz wurden die Zellen zuvor für 20 min in 4 % (w/v) para-Formaldehyd in PBS (pH 7.0) bei RT inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gespült.

Nach dem Eindeckeln der Zellen mit Aquatex (Merck) konnten die Objektträger bei 4°C im Dunklen gelagert werden.

3.35b RH 414

Der Endozytosefarbstoff RH 414 (Molecular Probes) wurde 1:1.000 in DMEM verdünnt und diese Lösung wurde auf die LLC-PK₁ Zellen pipettiert. Nach 20 min im Brutschrank wurde die Färbelösung abgeschüttet und die Zellen wurden 5 mal für 5 min mit eisgekühltem PBS-Puffer vorsichtig auf einem Taumelschüttler gewaschen bis die Waschlösung farblos blieb und die Zellen nach mikroskopischer Kontrolle nicht weiter entfärbt werden konnten. Die Zellen wurden anschließend sofort mikroskopiert und fotografiert.

3.35 AMG-Aufnahme von LLC-PK₁ Zellen

(Kimmich et al., 1994)

Die SGLT1 Aktivität in den LLC-PK₁ Zellen wurde anhand der Aufnahmeraten von α -Methylglucose [AMG] bestimmt. Durch die kompetitive Hemmung des SGLT1 mit Phlorizin konnte der Anteil des SGLT1 an der gesamten AMG-Aufnahme bestimmt werden.

Die LLC-PK₁ Zellen wurden zu Beginn suspendiert, pelletiert (3.32a) und anschließend in soviel PBS-Puffer aufgenommen, dass sich eine Proteinkonzentration von 5 bis 10 mg/ml ergab. Aus dieser bei 37°C aufbewahrten Zellsuspension wurden Proben von je 50 μ l für die Transportmessungen entnommen. Die Substratlösung aus DPBS-Puffer enthielt die gewünschte AMG-Konzentration einschließlich 1 μ Ci ¹⁴C-AMG (Amersham)/ ml. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 μ l Zellsuspension zu 200 μ l Substratlösung gestartet. Parallel wurde ein Ansatz mit zusätzlich 100 μ M Phlorizin (Sigma) durchgeführt. Nach 2.5

min bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden 200 µl des Reaktionsansatzes entnommen und in 1 ml eiskaltem DPBS-Puffer mit 1 mM Phlorizin (Stopplösung) überführt. Nach der Sedimentation der Zellen (8.000 g, 1 min) wurde der Überstand* entfernt und die Zellen in 1 ml Stopplösung gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Zellsediment wurde auf einem Rotationsschüttler 30 min in 100 µl 0.05 % (v/v) Triton-100 solubilisiert und anschließend mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit (LumasafeTMPlus, Packard) gemischt.

Im Szintillationszähler (Packard, 1600CA, USA) konnte die Strahlung gegen einen Leerwert aus Zellen mit 0 min Inkubationszeit gemessen werden.

*Als Referenzwert wurden 10 µl des Überstandes ebenfalls mit 100 µl 0.05 % (v/v) Triton-100 und 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil lässt sich in zwei Abschnitte gliedern. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Expression und Lokalisierung des pRS1-Proteins in verschiedenen Zellen. Eine wichtige Voraussetzung hierzu war die Verbesserung der bisher nur unbefriedigenden Signalstärke des RS1 im Westernblot. Des Weiteren wird die subzelluläre Verteilung des vollständigen RS1-Proteins und verkürzter RS1-Proteine mit Hilfe von GFP-Fusionen betrachtet. Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils werden Versuche zur funktionellen Seite des RS1 dargestellt. Hierzu wurde ein gefundenes Motiv (UBA-Domäne) untersucht und es wurden die Auswirkungen der RS1-Überexpression beschrieben.

4.1 Nachweis von RS1 bei verschiedenen Zellen im Westernblot

Um das RS1-Protein untersuchen zu können, wurde ein spezifisches Antiserum gegen RS1 gebraucht. Dazu hatte Marc Valentin ein anti-RS1 Serum, welches gegen die gesamte Sequenz des pRS1-Proteins (Serum 33_{IV}) gerichtet ist, geschaffen (Valentin et al., 2000).

4.1.1 Optimierung der RS1-Detektion

Für den Nachweis des pRS1-Proteins mit dem anti-RS1 Serum 33 im Westernblot war eine vorherige Reduktion des Proteins mit β -Mercaptoethanol unverzichtbar (Valentin, 1998). Um die Reduktion irreversibel zu machen, wurden die Proteinproben zusätzlich mit Jodacetamid behandelt, um eine Alkylierung der Cysteinreste zu erzielen. Die Abb. 4-1 zeigt einen Westernblot, der mit dem Antiserum 33 gegen RS1 entwickelt wurde. Die beiden Spuren unterschieden sich in der Vorbehandlung der Proteine.

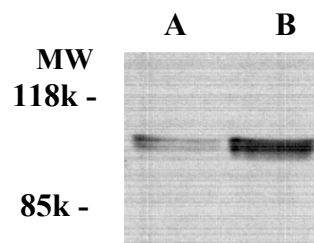


Abb. 4-1 Verstärkung der Detektion des pRS1 im Westernblot

Im SDS-PAGE wurden je 10 μ g BBM aus der Schweineiere aufgetrennt. Der Proteinprobe B wurde nach der Denaturierung im Laemmli-Puffer zusätzlich noch Jodactamid zugefügt. Die Detektion im Westernblot erfolgte mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 33_{IV}.

A: Proteinprobe ohne Jodacetamid; B: Vorbehandlung der Proteinprobe mit 100 mM Jodacetamid

Durch die Behandlung der Proteinprobe aus den Nieren-BBMs mit Jodacetamid wurde die Empfindlichkeit beim Nachweis von pRS1 [Abb. 4-1] mit dem anti-RS1 Serum 33 erhöht.

4.1.2 Nachweis des RS1-Proteins in Dünndarmzellen vom Schwein

Nach Optimierung der Detektionsbedingungen für das pRS1-Protein (4.1.1) wurde die Expression in den Zellen des Dünndarms überprüft [Abb. 4-2]. Das pRS1-Protein konnte nämlich bisher nicht im Dünndarm nachgewiesen werden, obwohl die Transcription des pRS1 im Dünndarm vom Schwein und Kaninchen in Northernblots eindeutig gezeigt worden war (Spangenberg et al., 1993, Reinhardt et al., 1998).

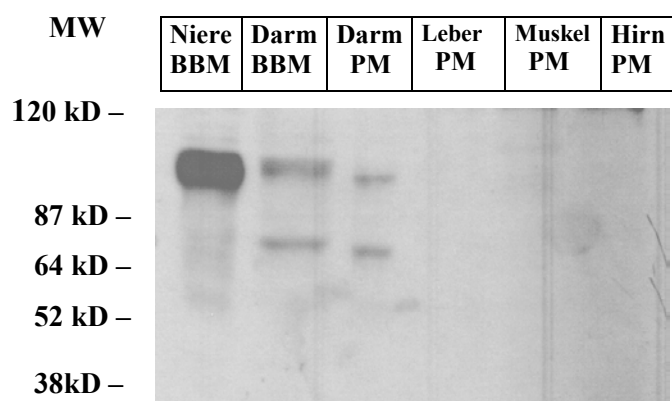


Abb. 4-2 Westernblot: Nachweis des pRS1-Proteins in der Niere und dem Dünndarm vom Schwein

Die BBM-Vesikel konnten aus frischem Gewebe nach schrittweiser Zugabe von CaCl_2 und wiederholter Zentrifugation als 48.000 g Pellet gewonnen werden (siehe 3.29). Die Fraktionen der angereicherten Plasmamembranen (PM) wurden nach differenzieller Zentrifugation als 40.000 g Sediment erhalten (siehe 3.29). Die Proteinproben wurden im Laemmli-Puffer denaturiert und anschließend mit Jodacetamid inkubiert. Nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des pRS1-Proteins das affinitätsgereinigte anti-RS1 Serum 33_{IV} eingesetzt.

Mit den BBM-Vesikeln der Niere konnte die stärkste Reaktion erzielt werden. Das pRS1-Protein bildete eine Bande bei 100 kD im SDS-PAGE, obwohl sich nach Addition der Aminosäuren in der Primärsequenz ein rechnerisches Molekulargewicht von 68 kD ergibt (Valentin et al., 2000).

In den Proteinproben des Dünndarms konnte pRS1 ebenfalls detektiert werden. Die Expression in den BBM-Vesikeln des Dünndarms war allerdings deutlich stärker als in der Fraktion der angereicherten Plasmamembranen. Zusätzlich war in den Proben des Dünndarms eine gleichstarke Bande bei etwa 65 kD vorhanden, die ein Fragment des pRS1-Proteins sein könnte. In den Membranproben der Leber, des Skelettmuskels und des Großhirns war kein pRS1-Protein nachweisbar. Dieser Befund deckt sich mit der nur sehr geringen Konzentration der pRS1-mRNA, die im Großhirn und der Leber im Northernblot nachgewiesen werden konnte (Spangenberg et al., 1993; Reinhardt et al., 1999). Im Skelettmuskel war RS1 nur mit einer RT-PCR nachweisbar (Reinhardt et al., 1999).

4.1.4 Nachweis von RS1 in Dünndarmzellen vom Schaf

Eine Kooperation mit Prof. Shirazi-Beechey (Aberystwyth, England) ergab die Möglichkeit, das RS1-Protein auch in Dünndarmzellen vom Schaf (sRS1) nachzuweisen. sRS1 ist noch nicht kloniert worden, aber die hohe Homologie der bisher bekannten RS1-Proteine aus Schwein, Mensch, Kaninchen und Maus ließ auch für sRS1 eine Erkennung durch das anti-RS1 Serum 33 vermuten. Das sRS1-Protein konnte im anti-RS1 Westernblot als Bande bei 100 kD erkannt werden [Abb. 4-4].

In der Arbeitsgruppe von Prof. Shirazi-Beechey wurden viele wichtige Erkenntnisse über den Einfluss von Glucose auf die Expression des SGLT1-Proteins gewonnen. So wird die Expression des Schaf-SGLT1 (sSGLT1) durch die Glucose-Konzentration im Darmlumen stark reguliert. Nach dem Abstillen der Lämmer sinkt die Konzentration der sSGLT1-Proteine in den Dünndarm-BBMs und kann beim adulten Tier erst durch die Reinfusion mit Glucose wieder drastisch gesteigert werden (Shirazi-Beechey et al. 1991, Lescale-Myts et al., 1993). Es stellte sich die Frage, ob auch die Konzentration des sRS1 in den Dünndarm-BBMs durch Glucose beeinflusst wird.

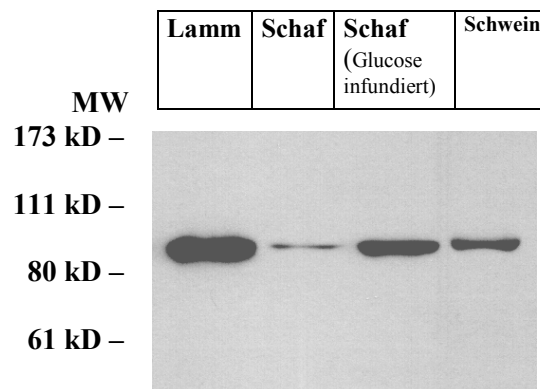


Abb. 4-4 Westernblot: Steigerung der RS1-Konzentration in Dünndarm-BBMs durch Glucose

Dünndarm-BBMs wurden aus Lämmern, die mit Milch ernährt wurden, aus adulten Schafen, die mit Gras gefüttert wurden und aus adulten Schafen, die über eine Darm-Sonde mit Glucose versorgt wurden, gewonnen. Je 20 µg der BBM-Proteine wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 75₁ entwickelt.

Die Konzentrationen des sRS1-Proteins in den Dünndarm-BBMs waren deutlich verschieden [Abb. 4-4]. Beim Lamm war das sRS1-Protein am stärksten exprimiert. Beim adulten Tier war die Menge des sRS1-Proteins hingegen drastisch reduziert. Erst nach direkter Glucose-Infusion über eine Sonde in den Dünndarm konnte ein Anstieg der Expression des sRS1-Proteins in den BBMs beobachtet werden. Somit veränderte sich die sRS1-Konzentration in gleicher Weise wie die des sSGLT1-Proteins als Antwort auf die Versorgung mit Glucose.

4.1.5 Nachweis und subzelluläre Verteilung von RS1 in LLC-PK₁-Zellen

Die LLC-PK₁ Zellen sind eine Zelllinie, welche von Epithelzellen des proximalen Nierentubulus aus dem Schwein stammen (Hull et al., 1976). Die mRNA des pRS1 in den LLC-PK₁ Zellen wurde schon 1993 nachgewiesen (Veyhl et al., 1993). Ebenso ist die endogene Expression des SGLT1-Proteins in diesen Zellen bekannt (Moran et al., 1982), welche komplex reguliert wird. Somit sind die LLC-PK₁ Zellen ein gutes Modellsystem, um die Wechselwirkung von RS1 mit SGLT1 zu untersuchen. Die Expression des SGLT1 setzt erst mit der Ausdifferenzierung der Zellen ein, die durch Zell-Zellkontakte induziert wird und somit erst im konfluenten Zustand von allen Zellen erreicht wird (Shioda et al., 1994). Weiterhin wird die Expression des SGLT1 durch das Glucoseangebot beeinflusst. Bei Erhöhung der Glucose-Konzentration von 5 auf 25 mM ist die Expression von SGLT1 stark vermindert (Ohta et al., 1990). Deshalb wurden die Zellen bei 5 und 25 mM Glucose-Konzentration kultiviert und vor und nach Erreichen der Konfluenz mittels differenzieller Zentrifugation subzellulär fraktioniert. Die gewonnenen Fraktionen wurden mit anti-RS1 Serum im Westernblot untersucht [Abb. 4-5].

Das vollständige pRS1 Protein (100 kD) konnte nur in den Fraktionen der angereicherten Plasmamembranen detektiert werden. In den subkonfluenten Zellen (Spur 1 und 2) waren die pRS1-Banden deutlich zu erkennen. Neben der 100 kD Bande war zusätzlich bei 63 kD ein pRS1-Fragment in der Plasmamembranfraktion zu erkennen. Ein RS1-Fragment ähnlicher Größe war auch bei der Detektion des pRS1 in Dünndarmzellen vorhanden [Abb. 4-2].

In der Fraktion der Plasmamembranen nach Konfluenz (Spur 3 und 4) konnte das pRS1 Protein nicht detektiert werden. In Westernblots mit höheren Proteinkonzentrationen (nicht abgebildet) konnte das pRS1-Protein auch nach Konfluenz in der Plasmamembranfraktion detektiert werden. Die Abb. 4-5 zeigt, dass die Glucose-Konzentration des Zellkulturmediums keinen signifikanten Einfluss auf die pRS1-Menge in der Plasmamembranfraktion besitzt.

In den Fraktionen des Zytoplasmas (5 bis 8) und der Endomembranen (9 bis 12) war unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen und dem Glucosegehalt des Mediums kein pRS1-Protein detektierbar.

In den Zellkernfraktionen hingegen wurde bei 40 kD ein Signal erhalten, welches bei den subkonfluenten Zellen (13 und 14) wesentlich schwächer als bei den konfluenten Zellen (15 und 16) war. Somit verhielt sich das 40 kD-Signal vor und nach Konfluenz genau umgekehrt zum Auftreten des pRS1-Proteins in der Plasmamembranfraktion. Die Veränderung der Glucose-Konzentration wirkte sich nicht auf das 40 kD-Zellkernsignal aus.

- Angereicherte Zellfraktionen -

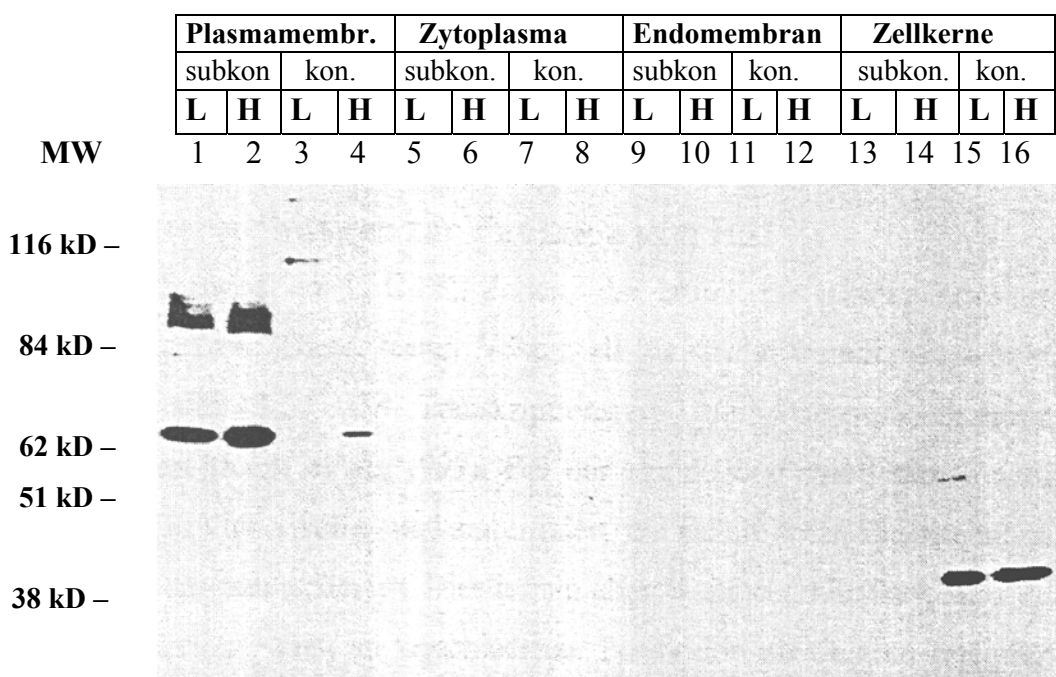


Abb. 4-5 Westernblot: RS1-Nachweis in fraktionierten LLC-PK₁ Zellen

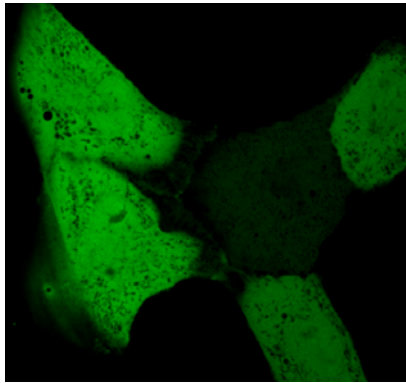
Die Zellen wurden in 5 und 25 mM Glucosemedium kultiviert und jeweils vor und nach Erreichen der Konfluenz geerntet, homogenisiert und anschließend mittels differenzieller Zentrifugation fraktioniert. Die Zellkernfraktion (1.200 g Sediment) wurde zusätzlich mit 0,5% Igepal gewaschen. Die gewonnenen Zellfraktionen wurden in Laemmli-Puffer denaturiert, mit Jodacetamid alkyliert und im Westernblot mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 33_{IV} untersucht. (Zellfraktionierung und Proteinbestimmung in Zusammenarbeit mit K. Baumgarten). Die Bande bei 110 kD in Spur 3 war ein Artefakt und konnte in anderen Blots (nicht abgebildet) mit Plasmamembranen differenzierter Zellen nicht beobachtet werden. **L:** 5 mM Glucose, **H:** 25 mM Glucose, **subkon.:** 50%ige Konfluenz, **kon.:** 5 Tage konfluent

Weil das RS1-Antiserum 33 gegen die gesamte pRS1-Sequenz gerichtet war (Valentin et al., 2000), konnten verschiedene Bereiche vom pRS1 detektiert werden. Es fällt auf, dass das 63 kD große Fragment in der Plasmamembranfraktion mit dem 40 kD großen Zellkernsignal rechnerisch wieder das vollständige pRS1 (100 kD) ergibt. Demnach hätte sich das RS1 Protein an der Plasmamembran in zwei Fragmente geteilt, wobei ein etwa 60 kD Fragment an der Plasmamembran verbliebe und ein ca. 40 kD Fragment in den Zellkern wandert. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass trotz der Affinitätsreinigung des RS1-Antiserums das 40 kD Signal im Zellkern die Folge einer Kreuzreaktion des Antiserums mit einem anderen Protein war.

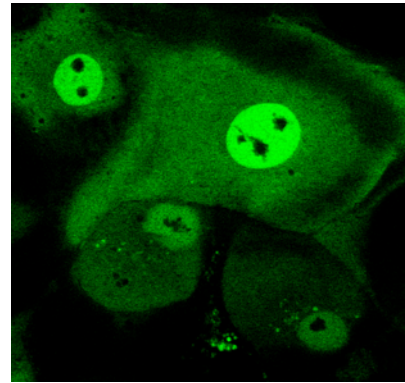
Um festzustellen, ob RS1 in den Zellkern wandern kann, wurde ein Fusionsprotein aus pRS1 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) von Katharina Baumgarten hergestellt und in LLC-PK₁ Zellen stabil exprimiert (Baumgarten, 1999). Die subzelluläre Verteilung wurde anschließend genauer in dieser Arbeit im Fluoreszenzmikroskop und im Westernblot untersucht (4.2).

4.2 Lokalisierung des pRS1 mittels GFP-Fusion

Die Fusion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) an den N-Terminus von pRS1 (GFP-pRS1) und Expression in LLC-PK₁ Zellen ermöglichte eine fluoreszenzmikroskopische subzelluläre Lokalisierung an lebenden Zellen [Abb. 4-6]. Durch Vergleich der subzellulären Fluoreszenz mit Zellen, die nur GFP exprimieren, konnten Rückschlüsse über die Wirkung von RS1 auf die subzelluläre Verteilung des GFP-RS1 gewonnen werden.



GFP (27 kD)



GFP-pRS1 (96 kD)

Abb. 4-6 Konfokale Laserscan-Mikroskopie: GFP und GFP-pRS1 stabil exprimierende LLC-PK₁-Zellen bei Blaulichtanregung

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen waren stabil mit dem pEGFP-C1 oder mit pEGFP-C1-pRS1 Vektor transfiziert (Baumgarten, 1999). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger aufgebracht. Unter Blaulichtanregung konnte die Verteilung der grünen Fluoreszenz der GFP-Moleküle beobachtet werden (Aufnahme: Dr. R. Hock).

LLC-PK₁ Zellen, die zur Kontrolle nur das GFP-Molekül exprimierten, fluoreszierten gleichmäßig im Zyto- und Nukleoplasma [Abb. 4-6, linkes Bild]. In den Zellkernen blieben die Nukleoli fluoreszenzfrei.

LLC-PK₁ Zellen, die GFP-pRS1 exprimierten, fielen durch eine akkumulierte grüne Fluoreszenz in den Zellkernen auf [Abb. 4-6, rechtes Bild]. Dabei zeigten die Nukleoli ebenfalls keine Fluoreszenz. Bei den meisten Zellen fluoreszierte auch das Zytoplasma. Die Intensität der Fluoreszenz im Zytoplasma war aber immer deutlich geringer als die in den Zellkernen. Wegen der relativ starken zytoplasmatischen Expression des GFP-pRS1 konnte an der Plasmamembran eine Fluoreszenz nicht eindeutig erkannt werden. Es war aber festzustellen, dass nach längerer Konfluenz die zytoplasmatische Fluoreszenz zurückging. Unter diesen Bedingungen konnte dann eine Fluoreszenz an der Plasmamembran erkannt werden [Abb. 4-7]

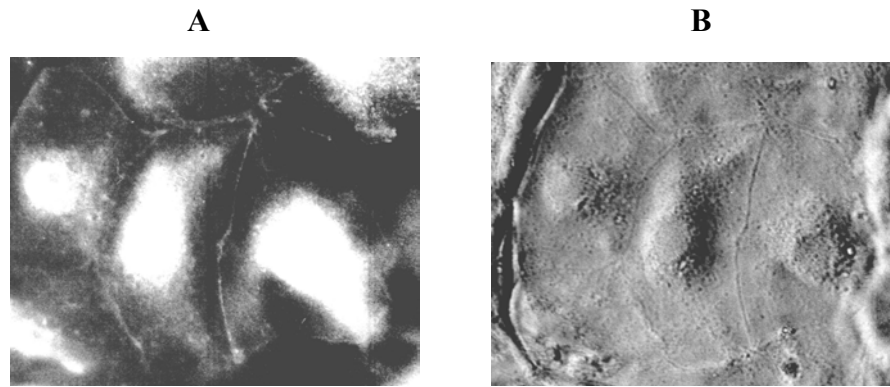


Abb. 4-7: Mikroskopische Aufnahmen der stabil GFP-pRS1 exprimierenden LLC-PK₁ Zellen

*Die GFP-pRS1 stabil exprimierenden Zellen wuchsen auf Deckgläschen und wurden nach Waschen mit PBS mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen befanden sich seit 14 Tagen im konfluenten Zustand. **A:** Fluoreszenzbild bei Blaulichtanregung; **B:** Phasenkontrastaufnahme*

Das GFP-pRS1-Fusionsprotein hat eine errechnete Molmasse von 96 kD und kann als intaktes Protein nicht durch Diffusion in den Zellkern gelangen (Peters, 1986; Doye et al., 1997). Um auszuschließen, dass die Fluoreszenz im Zellkern bei den GFP-pRS1 exprimierenden Zellen auf passive Diffusion von GFP-pRS1-Spaltprodukte beruht, wurde in Westernblots untersucht, ob GFP-pRS1 im Zellkern vollständig war. Dafür wurde die GFP und GFP-pRS1 exprimierenden Zellen fraktioniert und im Westernblot mit anti-GFP Serum analysiert

Der Westernblot mit den GFP exprimierenden Zellen [Abb. 4-8] zeigte, dass das GFP-Molekül nur in der Zytosolfraktion zu finden war. Die detektierte Bande bei 30 kD entsprach dem Molekulargewicht des GFPs von 27 kD. Obwohl im Fluoreszenzbild auch die Zellkerne eine Fluoreszenz aufwiesen [Abb. 4-6], zeigte der anti-GFP Westernblot in den Zellkernen kein GFP an. Dieser Befund war nicht verwunderlich, weil die Größe des GFPs mit 27 kD deutlich unter 60 kD lag und somit das GFP frei in den Zellkern diffundieren konnte. Beim Waschen der Zellkerne während der Zellkernpräparation wurde das GFP allerdings wieder aus den Zellkernen gespült.

Bei den GFP-pRS1 Zellen [Abb. 4-8] konnte mit dem anti-GFP Serum bei 125 kD eine Bande in der Zytoplasma-, Kern- und Plasmamembranfraktion detektiert werden, die zum erwarteten Molekulargewicht des GFP-pRS1 Fusionsprodukt passte, welches sich aus dem im SDS-Polyacrylamidgel bei 100 kD laufenden pRS1 und dem 27 kD großen GFP zusammensetzte. Somit konnte gezeigt werden, dass das vollständige GFP-pRS1 für die Fluoreszenz in den Zellkernen der GFP-pRS1 exprimierenden Zellen ursächlich war.

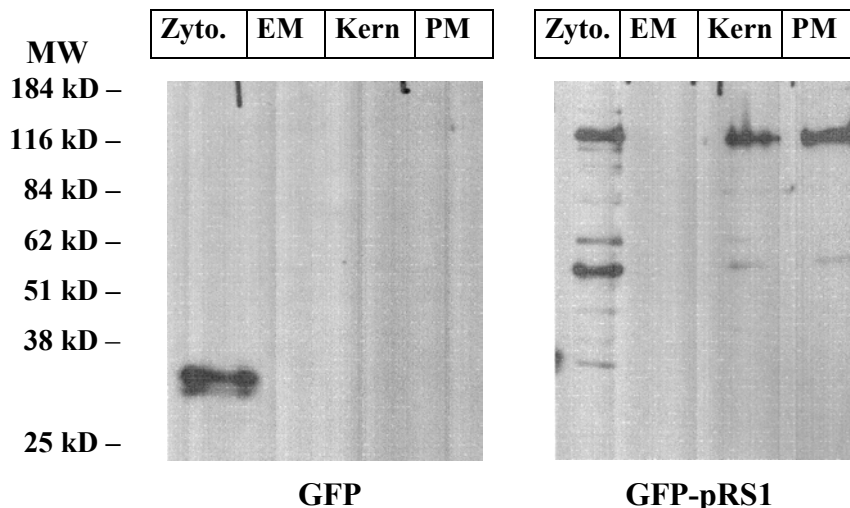


Abb. 4-8 Westernblot: Zellfraktionen der GFP und GFP-pRS1 exprimierenden Zellen

Die LLC-PK₁ Zellen wurden mittels differenzieller Zentrifugation fraktioniert. Die Zellkernfraktion (1.200 g Sediment) wurde zusätzlich mit 0,5% Igepal gewaschen. Je 10 µg Protein der Fraktionen wurden pro Spur aufgetragen. Der Westernblot wurde mit anti-GFP Serum (Clontech) analysiert.

Zyto: Zytoplasma, **EM:** Endomembranen, **Kern:** Zellkerne, **PM:** angereicherte Plasmamembranfraktion

In der Zytoplasmafraktion war zusätzlich ein ca. 52 kD großes Fragment enthalten. Weil sich das GFP am N-Terminus des pRS1 befand, musste dieses Fragment folglich auch vom N-Terminus des GFP-pRS1 Proteins stammen, denn der Westernblot war mit anti-GFP Serum durchgeführt worden.

Der anti-GFP Westernblot in Abb. 4-8 verdeutlichte, dass das pRS1-Protein das GFP-Signal in den Zellkern und an die Plasmamembran dirigieren konnte, während das alleinige GFP nur im Zytosol zu finden war.

Um die Daten mit einem weiteren Antikörper zu untermauern, wurden die Zellfraktionen der GFP-pRS1 Zellen im Westernblot auch mit anti-RS1 Serum entwickelt. Der Blot [Abb. 4-9] enthielt wie der anti-GFP Blot [Abb. 4-8] je 10 µg Protein pro Spur. Die hohe Reaktivität des anti-RS1 Serums 33 gegen das pRS1 Protein führten bei den GFP-pRS1 exprimierenden Zellen zu sehr starken Reaktionen in den Fraktionen des Zytoplasmas, der Zellkerne und der angereicherten Plasmamembranen. In der Fraktion der Endomembranen gab es im Vergleich zu den anderen Zellfraktionen nur eine sehr schwache Reaktion. Somit konnten die Ergebnisse zur subzellulären Verteilung des GFP-pRS1 nach Analyse mit dem anti-GFP Serum [Abb. 4-8] bestätigt werden. Gleichzeitig bewies der anti-RS1 Blot die korrekte Translation und Überexpression des pRS1-Proteinanteils am GFP-pRS1 Fusionsprotein.

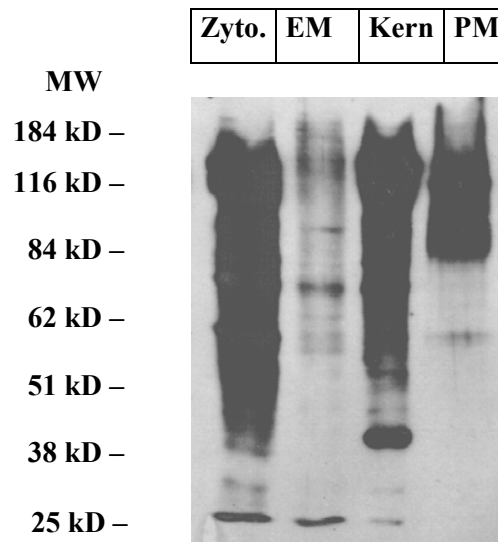


Abb. 4-9: Westernblot: Zellfraktionen der GFP-pRS1 stabil exprimierenden LLC-PK₁ Zellen

Die Zellen wurden mittels differenzieller Zentrifugation fraktioniert. Die Zellkernfraktion (1.200 g Sediment) wurde zusätzlich mit 0,5% Igepal gewaschen. Je 10 µg Protein der Fraktionen wurden pro Spur aufgetragen. Der Westernblot wurde mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 33_{IV} analysiert.

Zyto: Zytoplasma, **EM:** Endomembranen, **Kern:** Zellkerne, **PM:** angereicherte Plasmamembranfraktion

Das überexprimierte GFP-pRS1 Fusionsprodukt konnte in vollständiger Größe im Zellkern entdeckt werden. Es musste deshalb noch geklärt werden, warum bei den nativen LLC-PK₁ Zellen im Westernblot nur ein 40 kD Signal in der Zellkernfraktion detektiert werden konnte [Abb. 4-5]. Um Hinweise für das mögliche Auftreten eines pRS1-Fragmentes im Zellkern zu sammeln, wurde unter anderem untersucht, ob und welche trunkierten pRS1-Proteine in den Zellkern gelangen können (4.3).

4.3 pRS1 Trunkierungen und GFP-Fusion

In der Aminosäuresequenz des pRS1 konnten keine „Nuclear localisation signals“ (NLS) bestehend aus einer Anhäufung basischer Aminosäuren erkannt werden. Deshalb stellte sich auch zusätzlich die Frage, welche Bereiche bzw. Domänen im pRS1-Protein den Kernimport beeinflussen könnten. Auch um dieser Frage weiter nachzugehen, wurden verkürzte GFP-pRS1 Varianten hergestellt. Mit diesen Konstrukten wurden LLC-PK₁ Zellen transfiziert und anschließend im Fluoreszenz- und zusätzlich im konfokalen Laserscan-Mikroskop untersucht. Die Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop sind am Ende des Kapitels in Abb. 4-19 zusammengefasst worden

Um die transiente mit der stabilen Transfektion zu vergleichen, wurden zunächst die Zellen transient mit dem pEGFP-C1 Vektor transfiziert. Bezüglich der Verteilung der Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzmikroskop kein Unterschied im Vergleich zur stabilen Expression von

GFP-pRS1(AS 1-623)
96 kD

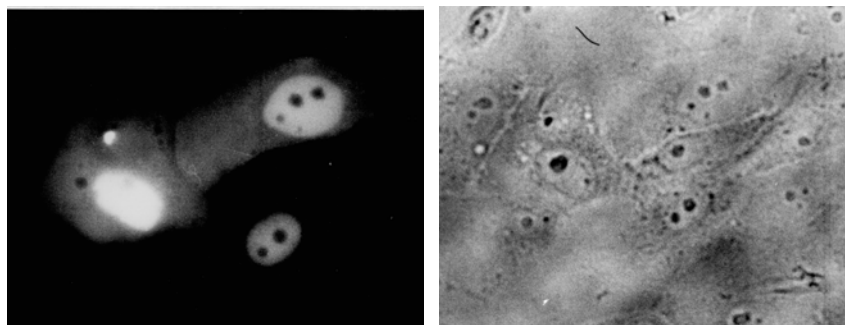


Abb. 4-12: Die Verteilung des GFP-pRS1 nach transienter Transfektion

Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-C1-pRS1 in PBS-Puffer überführt und lebend bei Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. links: Fluoreszenzbild; rechts: Phasenkontrastaufnahme

Bei der transienten Expression des pRS1-GFPs, bei dem GFP an den C-Terminus von pRS1 fusioniert worden war, zeigte sich eine etwas andere Verteilung [Abb. 4-13]. In einigen Zellen konnte zwar ebenfalls eine akkumulierte Kernlokalisierung beobachtet werden, aber in vielen schwächer exprimierenden Zellen verteilte sich die grüne Fluoreszenz gleichmäßig zwischen dem Zytoplasma und den Zellkernen [siehe auch Abb. 4-20].

pRS1(AS 1 – 623)-GFP
96 kD

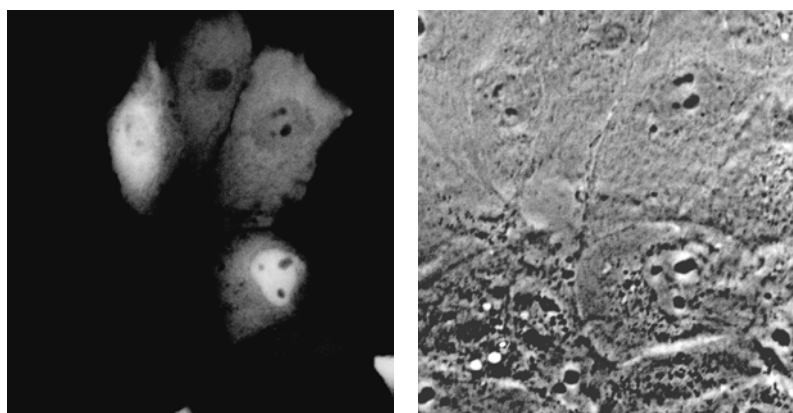


Abb. 4-13: Die Verteilung des pRS1-GFPs nach transienter Transfektion

Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-N3-pRS1 in PBS-Puffer überführt und lebend bei Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. links: Fluoreszenzbild; rechts: Phasenkontrastaufnahme

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die Fusion von GFP an den C-Terminus des pRS1 die Kernlokalisierung des pRS1 beeinflusst wurde. Da die Verteilung des pRS1-GFP inhomogen war und wahrscheinlich zusätzlich von noch unbekanntem Faktoren abhängig war, wurde für die weiteren Untersuchungen zur subzellulären Verteilung die N-terminale Fusion des GFPs für die folgenden verkürzten pRS1-Varianten gewählt.

Die in Abb.4-14 gezeigten Trunkierungen sollten Anhaltspunkte für den Einfluss der N- bzw. der C-terminalen Hälfte des pRS1 auf die subzelluläre Verteilung liefern. Um eine passive Diffusion der GFP-Fusionsproteine in den Nukleus zu verhindern, waren die Verkürzungen des pRS1 so gewählt, dass die GFP-Fusionsproteine eine Größe von 60 kD nicht unterschritten.

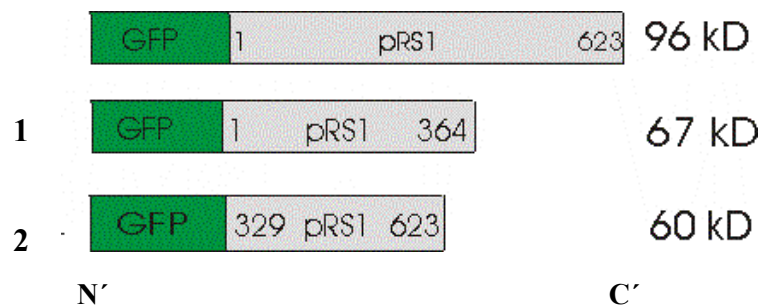
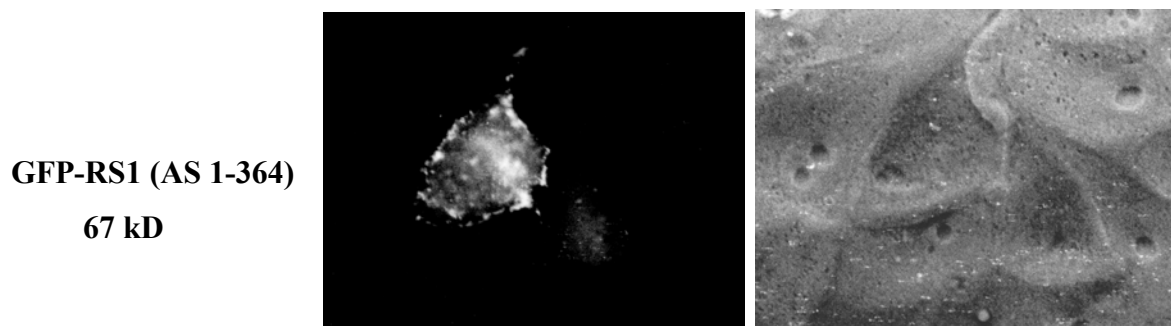


Abb. 4-14: GFP-Fusionen mit C- und N-terminal trunkierten pRS1-Proteinen

Die abgebildeten Fusionsproteine 1 und 2 konnten nach Ligation von zwei trunkierten pRS1-Genen in den pEGFP-C1 Vektor (Clontech) erhalten werden. 1: GFP-pRS1(AS 1-364); 2: pRS1-GFP(AS 329-623). Das vollständige pRS1 mit 623 AS ist nach Fusion mit GFP 96 kD groß.

Nach der Entfernung von 259 Aminosäuren am C-Terminus des pRS1 konnte ein gravierender Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung festgestellt werden. Dieses Konstrukt wurde nicht mehr im Zellkern angereichert [Abb. 4-15]. Außerdem war die Fluoreszenz im Zytosol nicht mehr gleichmäßig verteilt, sondern erschien punktiert. Die konfokalen Laserscan-Aufnahmen zeigten, dass die punktierte Fluoreszenz dieses Konstruktes gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt war [Abb. 4-20]. Dabei fiel auf, dass sich die Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran konzentrierte.



GFP-RS1 (AS 1-364)
67 kD

Abb. 4-15: Die Verteilung des GFP-pRS1 (AS 1-364) nach transienter Transfektion

Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-C1-pRS1(AS 1-364) in PBS-Puffer überführt und lebend bei Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. links: Fluoreszenzbild; rechts: Phasenkontrastaufnahme

Nach Trunkierung der ersten N-terminalen 328 Aminosäuren konnte die gleiche fluoreszenzmikroskopische Verteilung wie beim vollständigen GFP-pRS1 beobachtet werden [Abb. 4-16]. Im Zellkern war eine akkumulierte Fluoreszenz zu erkennen, wobei die Nukleoli ebenfalls fluoreszenzfrei blieben und das Zytoplasma schwächer fluoreszierte als die Zellkerne. Das bedeutete, dass die N-terminale Hälfte des pRS1 (AS 1-328) für den Kernimport und die Verteilung im Zytosol vollständig entbehrlich war.

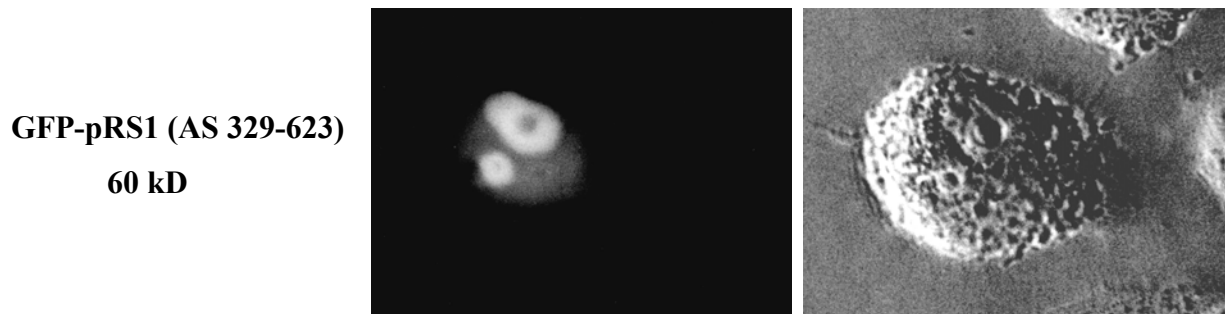


Abb. 4-16: Verteilung des GFP-pRS1(AS 329-623) nach transients Transfektion

Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-C1-pRS1(AS 329-623) in PBS-Puffer überführt und lebend bei Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. links: Fluoreszenzbild; rechts: Phasenkontrastaufnahme

Da die ersten Trunkierungsversuche nahe legten, dass die für die Kernlokalisierung verantwortliche „Proteindomäne“ sich in der C-terminalen Hälfte befindet, wurden zwei weitere Trunkierungen am C-Terminus von pRS1 hergestellt [Abb. 4-17].

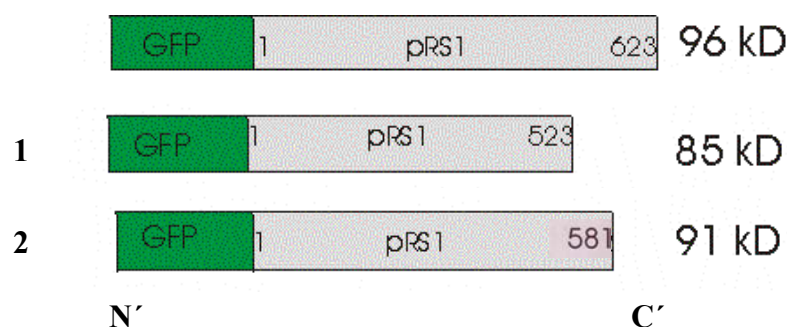


Abb. 4-17: Die C-terminalen Trunkierungen am GFP-pRS1 Fusionsprotein

Die abgebildeten Fusionsproteine 1 und 2 konnten nach Ligation von zwei trunkierten pRS1-Gene in den pEGFP-C1 Vektor (Clontech) erhalten werden. 1: GFP-pRS1 (AS 1-523); 2: pRS1-GFP (AS 1-581). Das vollständige pRS1 mit 623 AS ist nach Fusion mit GFP 96 kD groß.

Ohne die 100 C-terminalen Aminosäuren des pRS1 blieben die Zellkerne weitgehend fluoreszenzfrei [Abb. 4-18]. Im Zytoplasma konnte die kräftige Expression des GFP-pRS1

(AS 1-523) erkannt werden. Nur bei sehr wenigen Zellen (< 5 %) konnte auch im Zellkern eine schwache Fluoreszenz erkannt werden.

GFP-pRS1 (AS 1-523)
85 kD

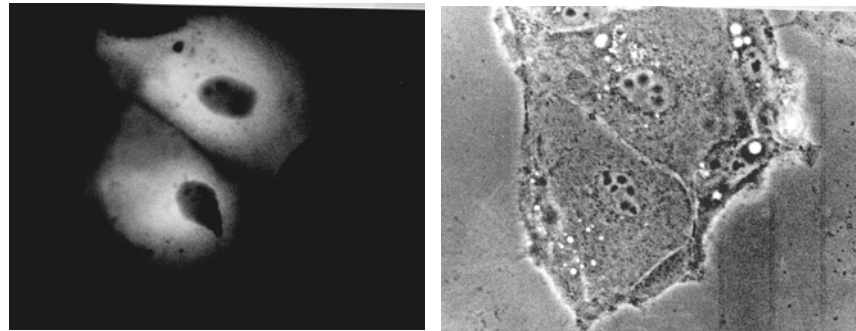


Abb. 4-18: Die Verteilung des GFP-pRS1(AS 1-523) nach transienter Transfektion

*Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-C1-pRS1(AS 329-623) in PBS-Puffer überführt und lebend bei Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.
links: Fluoreszenzbild; rechts: Phasenkontrastaufnahme*

In Abb. 4-19 ist die Fluoreszenzverteilung nach Transfektion der LLC-PK₁ Zellen mit GFP-pRS1 (AS 1-582) dargestellt. Die Fluoreszenz verteilte sich auf das Zytoplasma und teilweise auch auf die Zellkerne. Allerdings war wie beim dem pRS1-GFP Fusionsprodukt [Abb. 4-13] die Kernfluoreszenz im Vergleich zum Zytosol weniger intensiv [siehe auch Abb. 4-20]. Eine deutliche Akkumulation der Fluoreszenz im Zellkern wie beim vollständigem GFP-pRS1 (AS 1-623) [Abb. 4-12] oder beim N-trunkierten GFP-pRS1 (AS 329-623) [Abb. 4-16] war nicht mehr feststellbar. Es waren Zellen mit schwacher Kern-Fluoreszenz (~30 %) und Zellen, die nur im Zytoplasma grün fluoreszierten, vorhanden. Die Kernlokalisierung des GFP-pRS1 (AS 1-582) war ohne die letzten 42 C-terminalen Aminosäuren deutlich eingeschränkt, aber nicht vollständig aufgehoben worden.

GFP-RS1 (AS 1-581)
91 kD

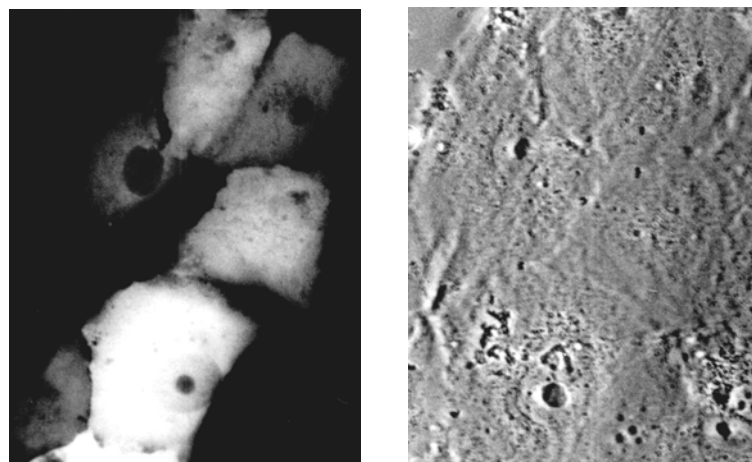


Abb. 4-19: Die Verteilung des GFP-pRS1(AS 1-581) nach transienter Transfektion

*Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-C1-pRS1(AS 1-581) in PBS-Puffer überführt und lebend bei Blaulichtanregung mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.
links: Fluoreszenzbild; rechts: Phasenkontrastaufnahme*

In Abb. 4-19 sind die Fluoreszenzverteilungen der verschiedenen GFP-pRS1 Varianten bei Betrachtung mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop zum besseren Vergleich nebeneinander abgebildet worden.

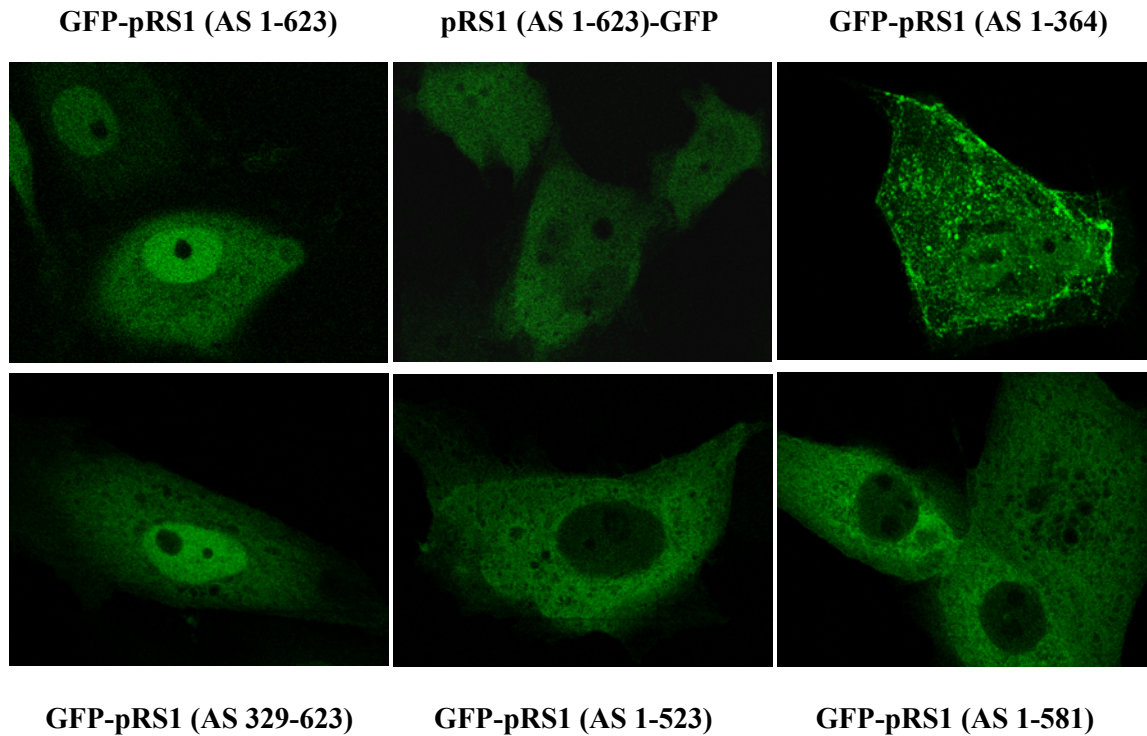


Abb. 4-20: Verteilung verschiedener pRS1-Varianten in LLC-PK₁ Zellen nach GFP-Fusion

Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 4% [w/v] Paraformaldehyd in PBS-Puffer fixiert und am konfokalen Laserscan-Mikroskop betrachtet. (Aufnahmen: Dr. R. Hock)

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Kernimport durch die Verkürzung des pRS1 um 100 Aminosäuren am C-Terminus am stärksten behindert worden war. Die Trunkierung um 42 Aminosäure behinderte die Kernlokalisierung weniger deutlich und macht klar, dass die 42 C-terminalen Aminosäuren die Kernlokalisierung nicht alleine kontrollieren.

Bei allen Varianten war im Zytosol eine Fluoreszenz zu beobachten, wobei die N-terminale Sequenz des pRS1 (AS 1-364) eine punktierte Fluoreszenz innerhalb der Zelle verursachte, die an eine vesikuläre Verteilung erinnert.

4.4 Die UBA-Domäne im C-Terminus des pRS1-Proteins

Die Ergebnisse zur Lokalisierung trunkierter pRS1-Proteine (4.3) zeigten eine Bedeutung des C-Terminus für die subzelluläre Verteilung des pRS1-Proteins auf. Die Analyse der RS1 Aminosäuresequenz mit SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; V 3,0) des

EMBL Heidelberg, Deutschland (<http://coot.embl-heidelberg.de/smart>) ergab im C-Terminus von AS 579 bis 616 eine deutlich sichtbare UBA-Domäne (Ubiquitin associated domain). Dieses Motiv befindet sich in dem am höchsten konservierten Abschnitt der RS1-Proteine (pRS1 AS 578-623; zu 94 % konserviert). Die UBA-Domäne ist ein Sequenzmotiv, welches in verschiedenen Enzymen des Ubiquitinierungsweges, DNA-Reperaturproteinen und wichtigen Proteinkinasen vorkommt (Hofmann and Bucher, 1996; Dieckmann et al., 1998). Über die spezifische Funktion dieser Domäne ist bisher sehr wenig bekannt. Die UBA-Domäne scheint eine Proteininteraktionsdomäne zu sein. Für die UBA-Domäne des p62 Proteins, einem Phosphotyrosin-abhängigen Liganden des p56^{lck}, konnte gezeigt werden, dass die UBA-Domäne in diesem Protein eine nicht-kovalente Bindung *in vitro* mit Ubiquitin ermöglicht (Ratna et al., 1996). Eine Affinitätschromatographie sollte klären, ob pRS1 ebenfalls tatsächlich in der Lage ist, Ubiquitin zu binden.

Als erstes wurde getestet, ob das in *E.coli* exprimierte rekombinante pRS1-Protein Ubiquitin binden konnte. Nach der Reinigung des rekombinanten pRS1 unter denaturierenden Bedingungen (3 M Harnstoff, 5 mM β -Mercaptoethanol) über Nickel-Agarose wurde das rekombinante pRS1-Protein über Centricons-30 (Amicon Inc., Beverly, USA) in 25 mM Tris/HCL pH 7.5, 100 mM NaCl umgepuffert, um die denaturierenden Reagenzien wie Harnstoff und β -Mercaptoethanol zu entfernen. Das so umgepufferte rekombinante pRS1-Protein wurde dann mit äquilibrierter Ubiquitin-Agarose (Calbiochem, Bad Soden) inkubiert. Danach wurde die Ubiquitin-Agarose gründlich im gleichen Puffer gewaschen und anschließend wurde eventuell gebundenes Protein mit Hilfe von SDS eluiert. Abb. 4-21 zeigt, dass das rekombinante pRS1 nach Inkubation mit Ubiquitin-Agarose im Eluat gefunden wurde. Wenn die Inkubation des rekombinanten pRS1 in Gegenwart von 250 μ M löslichem Ubiquitin durchgeführt wurde, so konnte im Eluat kein pRS1 gefunden werden.

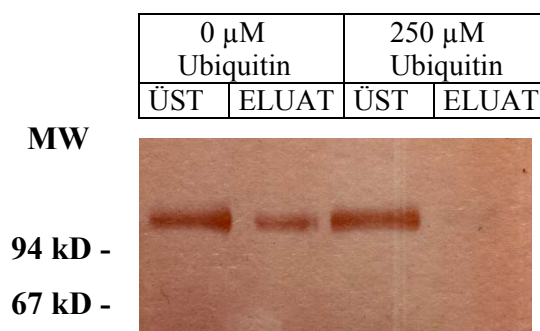


Abb.4-21 Silbergefärbtes PAA-Gel: Interaktion des rekombinanten pRS1 mit Ubiquitin-Agarose 9 μ g rekombinantes pRS1 in 90 μ l Tris-Puffer (100 mM NaCl, pH 7.5) wurde 2 h bei 4°C mit 25 μ l Ubiquitin-Agarose ohne und mit löslichem Ubiquitin inkubiert. Anschließend wurde die Ubiquitin-Agarose 3 mal mit 250 μ l Tris-Puffer (100 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und in Laemmli-Puffer denaturiert. (ÜST: Überstand)[2 mal reproduziert]

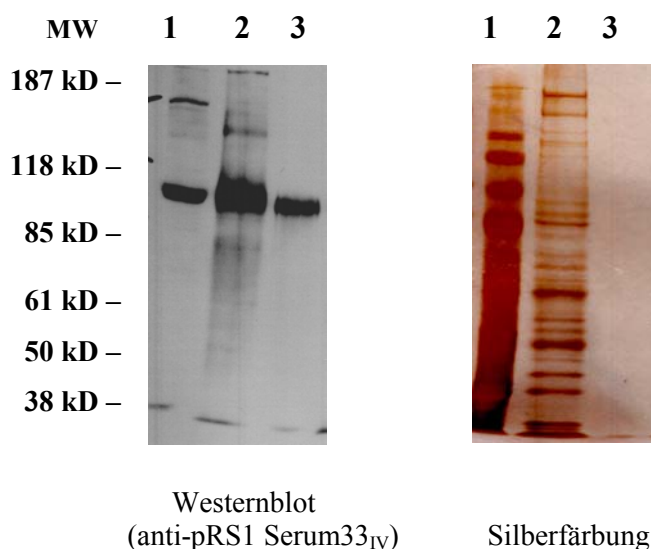
Um abzuschätzen, ob die Affinitätsreinigung des RS1 auf unspezifischen Proteininteraktionen mit der Ubiquitin-Agarose beruhen konnte, wurde ein analoger Versuch mit Serumalbumin vom Rind durchgeführt. Dabei konnte keine Interaktion des BSA mit der Ubiquitin-Agarose erkannt werden [Daten nicht gezeigt].

Im nächsten Schritt wurde versucht, natives pRS1 aus einer LLC-PK₁ Zelllinie, die pRS1 überexprimiert, mittels Ubiquitinaffinitätschromatographie anzureichern. Um die Interaktion des pRS1 mit der Ubiquitin-Agarose zu begünstigen, wurde das Zellhomogenat zuvor mit einem Anionenaustauscher (DEAE 52, Whatman) nach einer Methode von Ciechanover und Mitarbeitern (1978) vom zellinternen Ubiquitin befreit. Dazu wurden die pRS1 überexprimierenden LLC-PK₁ Zellen mit 1 % Igepal lysiert und die Zellkerne und Zelltrümmer durch eine niedertourige Zentrifugation entfernt. Das überstehende Lysat wurde mit DEAE-Agarose bei pH 7,5 inkubiert. Nach gründlichem Waschen der DEAE Agarose konnte mit 0.5 M KCl das ubiquitinfreie Zellhomogenat eluiert werden. Eine typische Proteinbilanz bei der Deubiquitinierung mit DEAE 52 ist in Abb. 4-22 aufgeführt.

	Volumen [µl]	Protein [µg]	Anteil [%]
Zellhomogenat	400	640	100
DEAE 52 0.5 M KCL ELUAT	650	227	35
DEAE 52 Überstand	400	230	36

Abb. 4-22:Proteinbilanz bei Auftrennung des LLC-PK₁ -Zellhomogenates über DEAE 52

Das DEAE 52 Eluat wurde mit Puffer verdünnt, um die KCl-Konzentration zu senken und anschließend mit Ubiquitin-Agarose inkubiert. Die interagierenden Proteine wurden mit Laemmli-Puffer eluiert und im Westernblot mit anti-pRS1 Serum und im silbergefärbten PAA-Gel analysiert. In der Spur 2 des anti-RS1 Westernblots [Abb. 4-23] war die deutliche Expression des pRS1-Proteins im Zellhomogenat der pRS1 überexprimierenden Zellen als Bande bei 100 kD zu erkennen. Nach der Inkubation mit Ubiquitin-Agarose konnte pRS1 im Eluat (Westernblot, Spur 3) wiederentdeckt werden. Im parallel durchgeführten silbergefärbtem PAA-Gel enthielt das Eluat der Ubiquitin-Agarose keine anfärbbaren Proteinbanden mehr, was die erfolgreiche Abtrennung anderer Homogenatproteine und damit die Anreicherung des pRS1 demonstriert.



Spur 1: BBM der Schweineniere; Positivkontrolle (30 µg)
 Spur 2: Homogenat der pRS1 überexprimierenden LLC-PK₁ Zellen (20 µg)
 Spur 3: 10 µl Eluat der Ubiquitin-Agarose

Abb. 4-23: Analyse der Interaktion des pRS1 mit Ubiquitin-Agarose

Die pRS1 stabil überexprimierenden LLC-PK₁ Zellen (Klon3) wurden lysiert in 25 mM Tris/HCL pH 7.5, 100 mM NaCl mit 1% [v/v] Igepal.. Die Zellkerne und unlysierte Zelltrümmer wurden sedimentiert bei 1.200 g. 37 µg des Überstandes (Homogenat) wurde 1 h bei 4°C mit DEAE 52 inkubiert. Das 0.5 M KCL-Eluat wurde 1:4 mit Tris-Puffer (25 mM Tris/HCL pH 7.5, 100 mM NaCl) verdünnt und mit 25 µl Ubiquitin-Agarose 2 h bei 4°C inkubiert. Im Überstand der Ubiquitin-Agarose konnten 32 µg Protein erhalten werden. Nach 3 mal Waschen der Ubiquitin-Agarose mit Tris-Puffer (25 mM Tris/HCL pH 7.5, 100 mM NaCl) erfolgte die Elution mit 20 µl Laemmli Puffer. Je 10 µl des Elutes wurden im anti-RS1 Westernblot und im proteingefärbtem PAA-Gel analysiert.[2 mal reproduziert]

In Anwesenheit von 30 µM löslichem Ubiquitin war die Interaktion des pRS1 aus den überexprimierenden LLC-PK₁ Zellen mit der Ubiquitin-Agarose sichtbar reduziert [Abb. 4-24]. Das Ergebnis zeigt, dass pRS1 Ubiquitin spezifisch bindet.

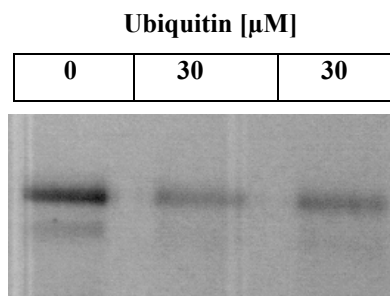


Abb. 4-24: Störung der Interaktion des pRS1 mit Ubi-Agarose durch lösliches Ubiquitin

Je 40 µg des verdünnten DEAE 52-Eluates [siehe auch Beschreibung Abb. 4.22] wurden mit je 25 µl Ubiquitin-Agarose (Calbiochem) ohne (1x) und mit löslichem Ubiquitin (Sigma) in einer Endkonzentration von 30 µM inkubiert (2x). Nach dem Waschen der Ubiquitin-Agarose mit Tris-Puffer (25 mM Tris/HCL pH 7.5, 100 mM NaCl) erfolgte die Elution mit je 30 µl Laemmli-Puffer und je 15 µl der Eluate wurden mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 33_{IV} im Westernblot analysiert.

Als nächstes wurde versucht, das pRS1-Protein aus Bürstensaummembranen (BBM) der Schweineniere mittels Ubiquitin-Affinitätschromatographie anzureichern. Die Nieren-BBMs stellen die reichste natürliche Quelle für natives pRS1-Protein dar. Die BBM-Vesikel wurden in 1% [v/v] Igepal solubilisiert und über DEAE 52 vom internen Ubiquitin und vom Igepal (Detergenz) befreit. Nach Inkubation mit Ubiquitin-Agarose wurde das Eluat im Westernblot und silbergefärbtem Polyacrylamid-Gel analysiert. Nach der Silberfärbung des Polyacrylamid-Gels konnte im Eluat der Ubiquitin-Agarose eine Doppelbande angefärbt werden, dessen obere Bande der exakten Laufhöhe des pRS1 bei 100 kD entsprach [Abb. 4-25, Silbergel]. Im Westernblot mit anti-pRS1 Serum zeigte sich, dass es sich dabei um pRS1 handelte [Abb. 4-25, Westernblot].

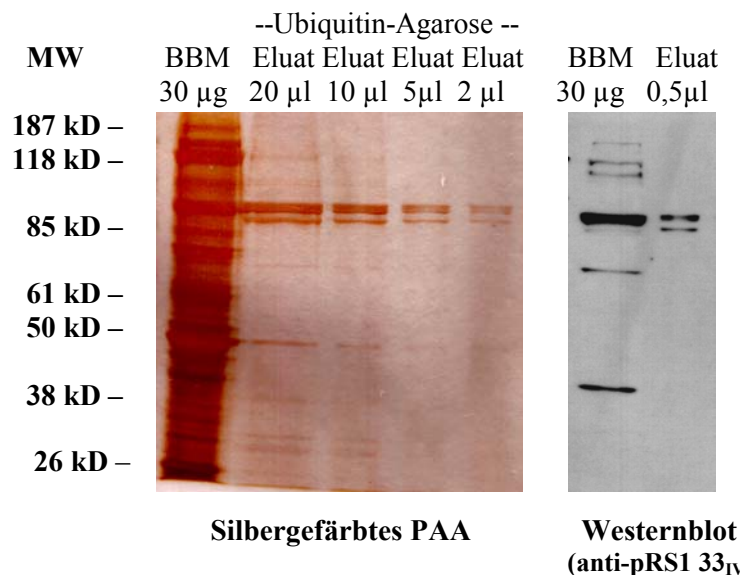


Abb. 4-25: Reinigung des pRS1-Proteins aus Schweinenieren-BBM-Vesikeln

Nieren-BBMs (7,2 mg Protein) wurden in 1% Igepal solubilisiert und mit DEAE 52 inkubiert. Nach Elution mit 0,5 M KCL wurden 900 µl Eluat (2,7 mg Protein) 1:4 mit Tris-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5) verdünnt und mit 50 µl Ubiquitin-Agarose (Calbiochem) 2 h bei 4°C inkubiert. Die Elution erfolgte mit 50 µl Laemmli-Puffer bei 37°C.

Um zu belegen, dass die Interaktion von pRS1 mit Ubiquitin über die C-terminale UBA-Domäne (AS 579-616) erfolgt, wurden weitere Affinitätsreinigungen mit vollständigem (AS 1-623) und C-terminal trunkiertem pRS1 (AS 1-512) durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde pRS1 bzw. das trunkierte pRS1 transient in HEK-Zellen exprimiert. Der Erfolg der Expression konnte im Westernblot mit anti-pRS1 Serum bestätigt werden [Abb. 4-26, Spur H]. Das vollständige pRS1 des Zellhomogenats lief wie das pRS1 aus den Nieren-BBMs bei 100 kD, während das trunkierte pRS1 (111 AS weniger) bei etwa 80 kD im SDS PAA-Gel lag.

Das pRS1-Protein wie auch das trunkierte pRS1-Protein konnten im Eluat des Anionenaustauschers DEAE 52 detektiert werden [Abb. 4-26, Spur DE52]. Somit war die Interaktion des trunkierten pRS1 (AS 1-512) mit dem Anionenaustauscher durch die C-terminale Trunkierung nicht beeinflusst worden. Während das vollständige pRS1 mit der Ubiquitin-Agarose interagiert und im Eluat auftaucht (Spur Ubi, links), war das trunkierte pRS1-Protein im Eluat der Ubiquitin-Agarose nicht nachweisbar [Abb. 4-26, Spur Ubi, rechts].

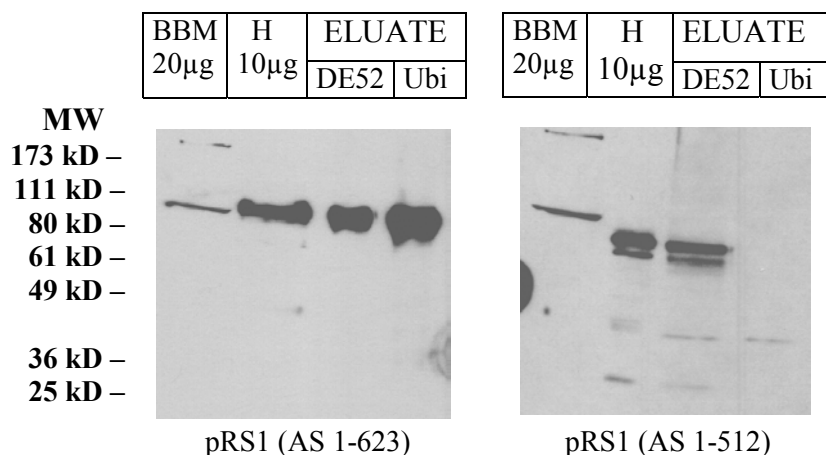


Abb. 4-26 Westernblot: Aufhebung der Interaktion des pRS1 mit Ubiquitin-Agarose nach Trunkierung des C-Terminus um 111 AS

HEK Zellen wurden mit pRC/CMV-pRS1 und pRC/CMV-pRS1(AS 1-512)-Vektoren transient transfiziert und nach 48 h mit 1% [v/v] Igepal lysiert. Nach der Deubiquitinierung mit DEAE 52 wurde das Eluat mit Ubiquitin-Agarose inkubiert. **BBM**: Bürstensaummembran aus der Schweineiniere (Positivkontrolle); **H**: Zellhomogenat; **DE52**: Eluat des Anionenaustauschers; **Ubi**: Eluat der Ubi-Agarose

Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Verlust der UBA-Domäne (AS 579-616) die Ursache für die fehlende Interaktion des trunkierten pRS1(AS 1-512)-Proteins mit der Ubiquitin-Agarose bildet.

4.5 Herstellung und Charakterisierung einer Zelllinie, die pRS1 stabil überexprimiert

LLC-PK₁ Zellen exprimieren das RS1-Protein (4.1.5) und wichtige Plasmamembrantransporter wie den Na⁺-D-Glucosekotransporter SGLT1. Leider ist die Menge des endogen exprimierten RS1 sehr gering (Valentin et al., 2000), was die proteinchemische Untersuchung des nativen RS1-Proteins erschwerte. Um die physiologische Rolle des pRS1 zu studieren und natives pRS1-Protein zu gewinnen (4.4), wurden pRS1 stabil überexprimierende LLC-PK₁ Zellen hergestellt. Nach Transfektion der LLC-PK₁-Zellen mit dem pRc/CMV-pRS1 Vektor wurden die transfizierten Zellen mit dem Antibiotikum Geneticin selektiert. Von den resistenten Zellkolonien wurden pRS1 überexprimierende Zellklone [pRS1(+)] gewonnen.

4 Klone wurden auf die Überexpression des pRS1 im Westernblot hin überprüft.

In den Homogenaten der pRS1(+)-Klone 1, 2, 4 und 9 konnte das pRS1-Protein als Bande bei 100 kD detektiert werden [Abb. 4-27], während in den Kontrollzellen (pRc/CMV-Leervektor) das pRS1-Protein im Homogenat nicht nachweisbar war.

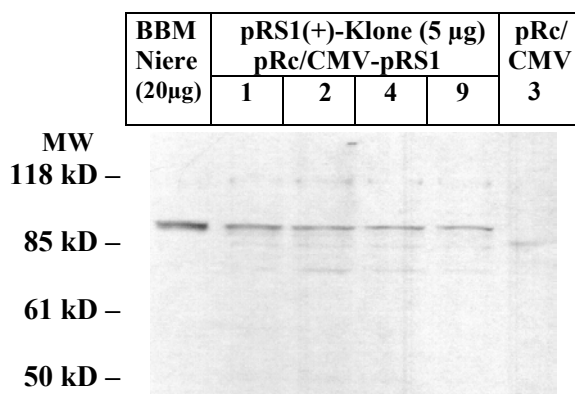


Abb. 4-27 Westernblot: Überexpression von pRS1 in den LLC-PK₁-Zellklonen 1, 2, 4 und 9

Je 5 µg der Zellhomogenate von verschiedenen pRc/CMV-pRS1(+)-Klonen und eines pRc/CMV-Kontroll-Klones 3 wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum_{33IV} im Westernblot analysiert.

Von pRS1 anti-sense LLC-PK₁-Zellen ist bekannt, dass bei Reduzierung der endogenen Translation des pRS1-Proteins mittels einer anti-sense-Strategie die Zellen eine drastisch erhöhte Aktivität des SGLT1 aufweisen (Korn, 1999). Um die physiologischen Auswirkungen der pRS1-Überexpression auf die Aktivität des endogenen SGLT1 ebenfalls zu prüfen, wurde die SGLT1-abhängige AMG-Aufnahme der pRS1(+)-Zellen gemessen [Abb. 4-28]. Die Transportleistungen der pRS1(+)-Klone 1, 4 und 9 betrug nur durchschnittlich ca. 10 % der Kontrollzellen. Der Transfektion mit dem pRc/CMV-Leervektor wirkte sich auf die AMG-Aufnahme im Vergleich zu den nativen LLC-PK₁ Zellen nicht signifikant aus.

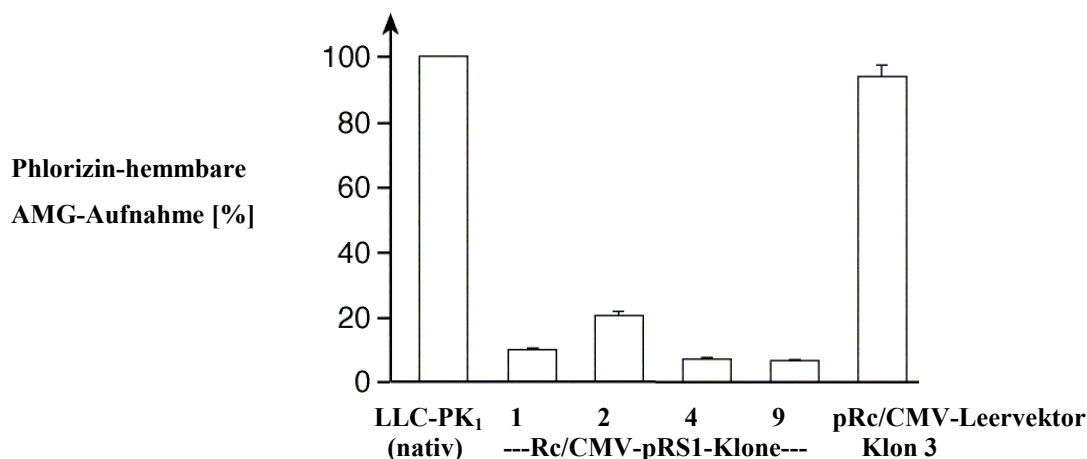


Abb. 4-28: Reduktion der AMG-Aufnahme bei den pRS1(+)-LLC-PK₁-Klonen

5 Tage nach Erreichen der Konfluenz (Medium 5mM Glucose) wurden die Zellen suspendiert und 2.5 min in $10 \mu\text{M } ^{14}\text{C-AMG}$ -inkubiert. Aus den Werten der Aufnahme rate wurde der phlorizinhemmbarer Anteil (SGLT1 spezifisch) bestimmt. (Messung: Irina Schatz)

Mit dem pRS1(+)-Klon 2 wurde die Substratabhängigkeit der AMG-Aufnahme bestimmt, um festzustellen, ob bei den überexprimierenden Zellen die Maximalgeschwindigkeit des Transportes oder die Affinität verändert war.

Die Kinetik der AMG-Aufnahme des pRS1(+)-Klon 2 ergab nach der Michaelis-Menten Gleichung einen V_{max} -Wert von $166 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und einen K_{M} -Wert von $361 \pm 72 \mu\text{M}$ [Abb. 4-29]. Bei nativen LLC-PK₁-Zellen konnte ein V_{max} -Wert von $2030 \pm 50 \text{ pmol / mg}$ und ein K_{M} -Wert von $790 \pm 40 \mu\text{M}$ ermittelt werden (Korn, 1999). Damit erreichte die maximale Transportrate des pRS1(+)-Klons 2 nur ca. 8 % der nativen LLC-PK₁ Zellen während der K_{M} -Wert sich halbierte. Der geringe K_{M} -Wert der Zelllinie 2 ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine Folge der verringerten Transportrate dieser Zellen. Denn bei der AMG-Aufnahmemessung verändert sich das Membranpotential der Zellen in Abhängigkeit vom Na^+ -Glucosekotrtransport. Da gezeigt worden ist, dass der K_{M} -Wert mit ansteigendem Membranpotential abnimmt (Kimmich et al., 1994), ist zu erwarten, dass in Zellen mit hohen Transportraten auch höhere K_{M} -Werte gemessen werden.

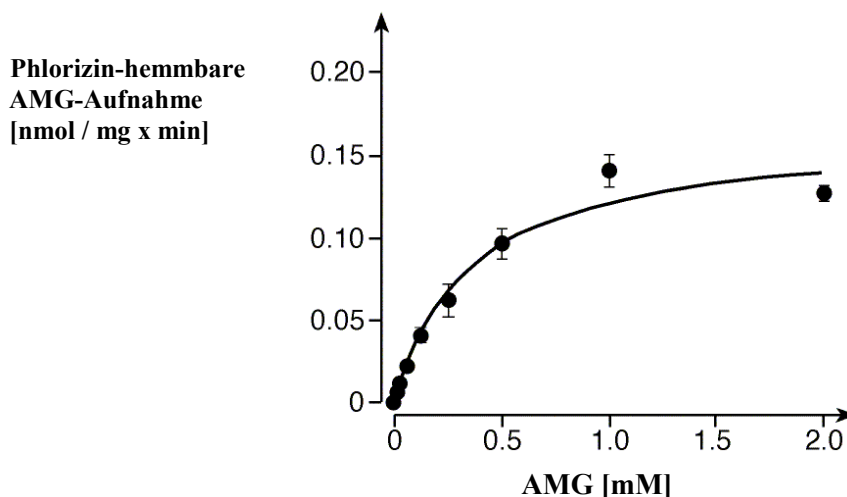


Abb. 4-29: AMG-Substratkinetik des LLC-PK₁-pRS1(+)-Klons 2

Nachdem die Zellen (5 mM Glucose Medium) 5 Tage konfluent waren, wurde die $^{14}\text{C-AMG}$ -Aufnahme nach 2,5 min mit suspendierten Zellen ermittelt. Die gemessenen Transportraten wurden um den nicht mit Phlorizin hemmbaren Anteil korrigiert. (Messung: Irina Schatz)

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Verringerung des V_{max} -Wertes auf einer Reduktion des SGLT1 in der Plasmamembran beruhte. Im Westernblot [Abb. 4-30] konnte das SGLT1-Protein bei den Kontrollzellen (pRc/CMV-Leervektor) als Bande bei 70 kD

detektiert werden. Bei den pRS1(+)Zellen (Klon 2 und 4) reichte die Expression des pSGLT1-Proteins in der Plasmamembran für eine Detektion im Westernblot nicht aus.

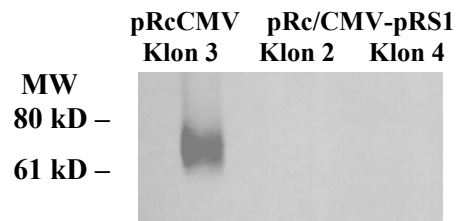


Abb. 4-30 Westernblot: Reduktion des pSGLT1 in der Plasmamembran der pRS1(+)-Klone

Am 5. konfluenten Tag wurden die LLC-PK₁ Zellen mittels differentieller Zentrifugation fraktioniert und je 20 µg der Plasmamembranfraktionen (40.000 g Sediment) wurden im Westernblot mit affinitätsgereinigtem anti-pSGLT1-Serum 63₁ analysiert.

Mit einem Northernblot sollte geklärt werden, ob die Erniedrigung der Proteinmenge des pSGLT1 in der Plasmamembran nach Überexpression von pRS1 auf eine Verringerung der SGLT1-mRNA beruhte. Hierzu wurde aus den pRS1(+)-Klonen 2 und 4 die Gesamt-RNA und daraus die mRNA isoliert und im Northernblot mit einer spezifischen pSGLT1-cDNA Sonden (Nukleotide 1546-1818) hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung mit mRNA wurde der Blot auch mit einer Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GPDH)-cDNA Sonde (Clontech, Heidelberg) hybridisiert. Zusätzlich wurde der Blot auch mit einer Vassopressin Rezeptor (V2R)-cDNA Sonde analysiert (Gorboulev et al., 1993), um die Auswirkungen der Überexpression des pRS1-Proteins neben dem SGLT1 auch auf ein weiteres Plasmamembranprotein des LLC-PK₁ Zellen zu untersuchen [Abb. 4-31].

Die Hybridisierung mit der pSGLT1-Sonde führte im Northernblot zu Banden bei 3,9 und 2,2 kB, wie schon von Ohta und Mitarbeitern (1990) gezeigt wurde. In den Kontrollzellen mit dem pRc/CMV-Leervektor konnte eine deutlich höhere Konzentration an SGLT1-mRNA als in den pRS1(+)-Zellklonen 2 und 4 nachgewiesen werden. Die SGLT1-mRNA war in den RS1(+)-Zellen kaum noch zu detektieren. Die Hybridisierung mit der GPDH-Sonde führte bei allen Zellen zu einer gleichstarken Reaktion bei 1,3 kB, womit die gleichmäßige Beladung des Blots mit mRNA gezeigt werden konnte. Als ein beispielhaftes weiteres Membranprotein wurde die Hybridisierung mit einer V2R-Sonde gewählt, wobei sich keine signifikanten Konzentrationsveränderungen der V2R-mRNA zeigten.

Während bei den pRS1 anti-sense LLC-PK₁ Zellen eine drastische Erhöhung der SGLT1-mRNA festgestellt werden konnte (Korn, 1999), hatte die Überexpression des pRS1 in den

LLC-PK₁ Zellen eine genau gegenteilige Wirkung und führte zur deutlichen Reduzierung der SGLT1-mRNA.

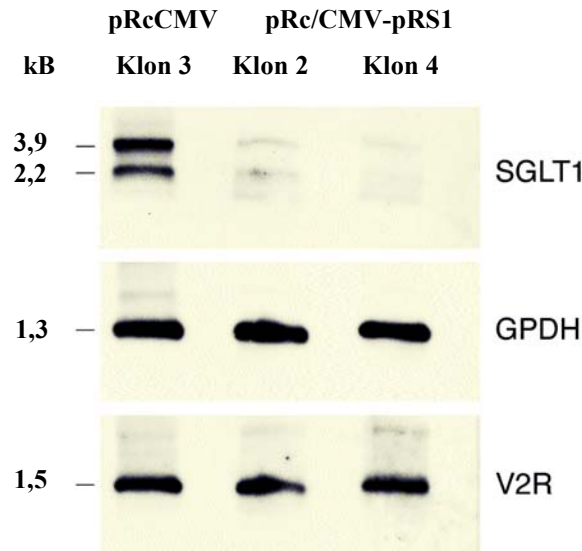


Abb. 4-31 Autoradiographie: Reduzierung der SGLT1- mRNA nach Überexpression von pRS1 in LLC-PK₁ Zellen

Nach 5 Tagen im konfluenten Zustand wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen gefällt, um daraus die mRNA zu gewinnen. Nach photometrischer Quantifizierung wurden je 5 µg der mRNAs im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebロットet und mit SGLT1-, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase- (GPDH) und Vasopressin-Rezeptor (V2R)-cDNA Sonden hybridisiert.

Diese Daten zeigen, dass die Überexpression von RS1 in konfluenten LLC-PK₁ Zellen zu einer Erniedrigung der mRNA-Menge des Na⁺-D-Glucosekotransporters SGLT1 führt.

4.6 RS1 und Endocytose

Die Expression des hRS1 in *Xenopus* Oocyten führt zu einer Verringerung der Oocytenoberfläche um annähernd 40 % (Valentin et al., 2000). Weil bei der Expression in *Xenopus* Oocyten die Transcription keine Rolle spielt, musste dieser Effekt posttranscriptional verursacht worden sein. Eine mögliche Erklärung würden Veränderung der endo- bzw. exozytotischen Vorgänge an der Plasmamembran liefern.

Bei der Analyse der RS1 AS-Sequenzen fiel ein konserviertes Di-Leucin Signal (pRS1: AS 366/67) auf, welches ein bekanntes Endozytose Motiv für z.B. den Insulin- und β-adrenergen -Rezeptor darstellt (Haft et al., 1998). In einem orientierenden Versuch sollte getestet werden, ob RS1 an endozytotischen Vorgängen beteiligt ist und die Aufnahme des hydrophoben Farbstoffes RH 414 (Molecular Probes, Beaverton, OR) in LLC-PK₁ Zellen bei Überexpression von pRS1 verändert ist. Der rot fluoreszierende Farbstoff RH 414 besitzt

die Eigenschaft, sich in die Plasmamembranen einzulagern, ohne durch die Membran diffundieren zu können. Weil RH414 nur durch Endozytose ins Zellinnere gelangen kann, wird er häufig zum Nachweis der Endozytose eingesetzt (Niles and Malik, 1999).

Es fiel auf, dass die pRS1 überexprimierenden Zellen die stärksten Anfärbungen nach 20 min Inkubation mit RH 414 zeigten [Abb. 4-32, rechts]. Deutlich konnte eine breite Rotfärbung im Bereich der Zellperipherien erkannt werden, welche bei den Kontrollzellen mit dem pRc/CMV-Leervektor (Mitte) und bei den pRS1 anti-sense Zellen (Korn, 1999) nicht vorhanden war.

Auch innerhalb der Zellen und besonders im Bereich um die Zellkerne konnte eine vesikuläre Verteilung des Farbstoffs erkannt werden, welche von den pRS1 antisense über die pRC/CMV-Zellen zu den RS1(+)-Zellen ebenfalls zunahm.

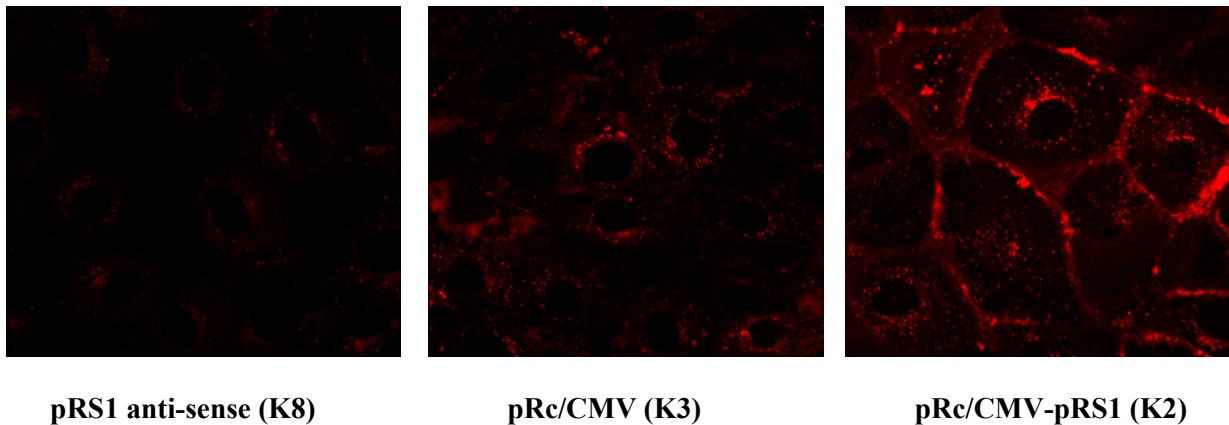


Abb. 4-32 Konfokales-Laserscan-Bild: Färbung mit dem Endozytose-Farbstoffs RH 414

Die stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen wurden 20 min bei 37°C mit RH 414 in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS-Puffer 5 mal für 5 min auf einem Taumelschüttler gewaschen, um die Endozytose zu stoppen und den extrazellulären Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Zellen sofort im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Die Ergebnisse zu diesem Versuch deuten an, dass RS1 endozytotische Vorgänge an der Plasmamembran fördert.

4.7 Phosphorylierung des pRS1-Proteins

Die bisher klonierten RS1-Proteine aus dem Schwein, Menschen, Kaninchen und Maus weisen 2 konservierte Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) und 3 für die Caseinkinase II (CK II) auf (Baumgarten, 1999). Daneben sind zusätzliche Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) vorhanden.

Die Proteinphosphorylierung stellt eine bedeutende posttranslationale Modifikation dar, über welche die Funktion des RS1-Proteins und dessen Translokationen innerhalb der Zelle gesteuert werden könnte. Es war deshalb wichtig zu wissen, ob RS1 tatsächlich phosphoryliert werden kann. Für die Untersuchung einer Phosphorylierung *in vivo* ist die Aufreinigung des pRS1-Proteins z.B. durch eine Immunpräzipitation erforderlich. Weil mit dem anti-RS1 Serum keine quantitative Präzipitation des RS1-Proteins gelang, wurden Phosphorylierungsversuche mit dem rekombinanten in *E.coli* exprimierten RS1-Protein durchgeführt.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A ist ein Proteinkomplex aus katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit induziert eine Konformationsveränderung und Dissoziation des Kinase A Proteinkomplexes, wodurch die katalytische Untereinheit aktiviert wird.

Abb. 4-33 zeigt die Ergebnisse zur Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 und des als Positivkontrolle eingesetzten dephosphorylierten Caseins durch die PKA. Im Versuch wurde die PKA durch die Zugabe von cAMP aktiviert. Die autophosphorylierenden Eigenschaft der PKA konnte anhand der autoradiographischen Signale der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten bei 38 und 49 kD erkannt werden. Nach Aktivierung der PKA durch cAMP war eine deutliche Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 zu beobachten. Das mit ^{32}P phosphorylierte pRS1 Protein bildete eine autoradiographische Bande bei 100 kD. Ohne cAMP war eine Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 nicht zu erkennen.

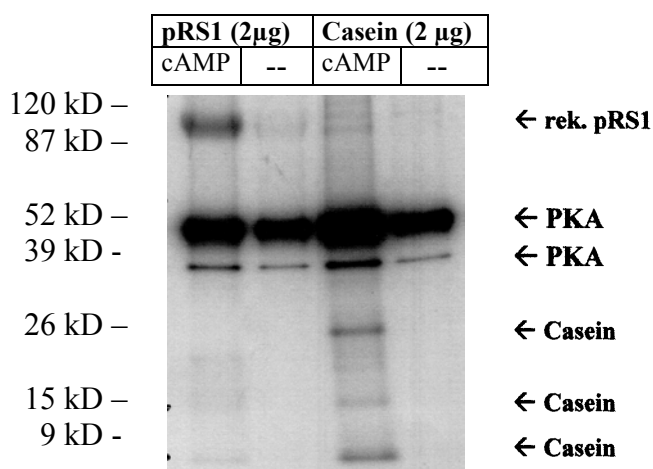


Abb. 4-33 Autoradiographie: Phosphorylierung von RS1 und Casein durch Proteinkinase A

Rekombinantes pRS1 (rek. pRS1) und dephosphoryliertes Casein wurden bei 30°C 20 min mit Proteinkinase A und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Nach Zugabe von cAMP wurde die PKA aktiviert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Trichloracetat gestoppt. Die auf Eis gefällten Proteine wurden

bei 10.000 g sedimentiert, in Laemmli-Puffer denaturiert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, vakuumgetrocknet und einem Röntgenfilm aufgelegt.

Als Positivkontrolle wurde dephosphoryliertes Casein eingesetzt. Nach cAMP-Aktivierung konnte die Phosphorylierung des α , β und γ Caseins ebenfalls beobachtet werden. Obwohl Casein ein gängiges Testsubstrat für die PKA ist, konnte für Casein kein stärkeres autoradiographisches Signal als für das rekombinante pRS1-Protein erzielt werden.

Der Versuch zeigte eindeutig, dass eine PKA-abhängige Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 *in vitro* möglich war.

Die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) ist ebenfalls streng reguliert. Zur *in vitro* Aktivierung der PKC war die Zugabe von Phosphatidylserin (PS) und CaCl_2 notwendig. Mit EGTA hingegen konnte die Aktivität der PKC gehemmt werden.

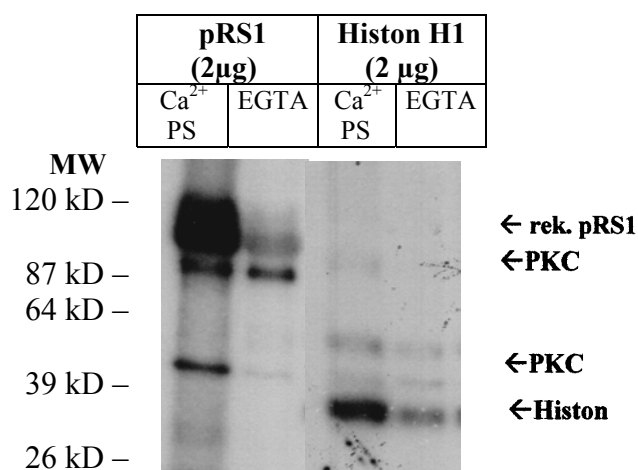


Abb. 4-34 Autoradiographie: Phosphorylierung von RS1 und Histon H1 durch Proteinkinase C

Rekombinantes pRS1 und Histon 1 wurden bei 30°C für 20 min mit Proteinkinase C und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Durch die Zugabe von Phosphatidylserin (PS) und Ca^{2+} wurde die PKC aktiviert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von TCA gestoppt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die gefällten Proteine sedimentiert (10.000 g) und im SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, vakuumgetrocknet und mit einem Röntgenfilm analysiert.

Die autophosphorylierenden Eigenschaft der Proteinkinase C (aus Rattenhirn enthält α , β_1 , β_2 und γ PKC-Isoformen, Calbiochem) war an den autoradiographischen Signalen bei 90 und 45 kD zu erkennen [Abb.4-34]. Nach Aktivierung der PKC mit Phosphatidylserin und CaCl_2 konnte die Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 (100 kD) und des Histons H1 [als Positivkontrolle] (30 kD) beobachtet werden. Bei Zugabe von EGTA ohne Phosphatidylserin und CaCl_2 war eine wesentlich schwächere Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 und Histons H1 im Autoradiogramm festzustellen. Die Präzipitation der Proteine im Histon-

Phosphorylierungsansatz war nur unvollständig, wie man an den fehlenden autoradiographischen Signalen des PKC erkennen konnte. Dieses änderte aber nichts an der Aussage, dass eine PKC abhängige *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 möglich war.

Abb. 4-35 zeigt einen Versuch, bei welchem eine *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 durch Caseinkinase II (CaK II, Human, Rekombinant, aus *E.coli*, Calbiochem) überprüft wurde. Die CaK II ist ein Tetramer ($\alpha_2\beta_2$) aus zwei α (44 kD) und zwei β (26 kD) Untereinheiten.

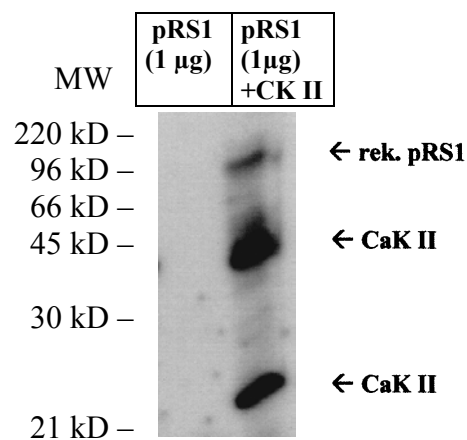


Abb. 4-35 Autoradiographie: Phosphorylierung des RS1 durch Caseinkinase II

Rekombinantes pRS1 (*rek.pRS1*) alleine und *rek.pRS1* gemeinsam mit Caseinkinase II (CaK II) wurden bei 30°C für 20 min in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe Laemmli-Puffer gestoppt und im SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, vakuumgetrocknet und mit einem Röntgenfilm analysiert.

Das rekombinante pRS1 wurde durch die CaK II erfolgreich phosphoryliert und bildete bei 100 kD eine Bande [Abb. 4-35, rechte Spur]. Wie es auch schon bei den Phosphorylierungsansätzen mit der PKA und PKC gesehen worden war, konnte auch für die CaK II eine Autophosphorylierung ihrer Untereinheiten (44 und 26 kD) festgestellt werden.

Als Kontrolle auch für die bisherigen *in vitro* Phosphorylierungen wurde das rekombinante RS1 alleine mit $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ ohne die Anwesenheit einer Kinase inkubiert. Dabei wurde kein autoradiographisches Signal und damit keine autophosphorylierende Eigenschaft des rekombinanten pRS1 erkannt [Abb. 4-35, linke Spur]. Das bewies, dass die autoradiographischen Signale des rekombinanten pRS1 nur die Folge einer Wechselwirkung mit der PKA, PKC und CK II sein konnten.

In Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Weber (Institut für Strahlenkunde, Würzburg, AK Prof. Rapp, SFB 471) wurde ein eventueller Zusammenhang des RS1 mit dem MAP-Kinasen-Signalweg untersucht. Das rekombinante pRS1 wurde als potentiell Substrat der Raf-Kinase und der MEK-Kinase *in vitro* getestet. Die aktive Raf-Kinase phosphoryliert die MEK-Kinase an zwei Serinresten, was zur Aktivierung der MEK-Kinase führt (Avruch et al., 1994). Im Versuch wurde überprüft, ob RS1 durch die Raf- oder die aktivierte MEK-Kinase phosphoryliert werden kann [Abb. 4-36].

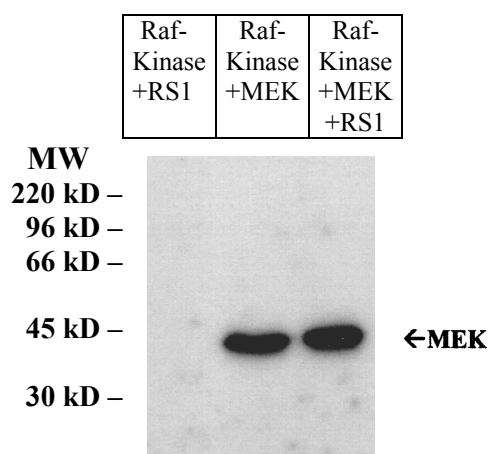


Abb. 4-36 Autoradiographie: Test von RS1 als Substrat der Raf- und MEK-Kinase

Rek. pRS1 wurde mit der Raf-Kinase (links) und der Raf-aktivierten-MEK-Kinase (rechts) bei 30°C für 20 min in Anwesenheit von $\gamma^{32}P$ -ATP inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe Laemmli-Puffer gestoppt und im SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, vakuumgetrocknet und einem Röntgenfilm exponiert.

Das rekombinante pRS1 wurde von der aktiven Raf-Kinase nicht phosphoryliert, wie man an dem fehlenden autoradiographischen Signal erkennen kann [Abb. 4-36, linke Spur]. Die Aktivität der Raf-Kinase konnte durch die erfolgreiche Phosphorylierung von MEK (47 kD) demonstriert werden [Abb. 4-36, Mitte]. Aber auch die phosphorylierte und damit aktive MEK phosphorylierte RS1 nicht (Spur 3).

Der Versuch der *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 mit MEK und der Raf-Kinase, für welche in der RS1 AS-Sequenz keine potentiellen Phosphorylierungssequenzen enthalten sind, zeigte, dass eine Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 nicht durch jede Serin/Threonin-Kinase erfolgen konnte.

5. DISKUSSION

Der Diskussionsteil beginnt mit den Ergebnissen zum Vorkommen des RS1-Proteins in verschiedenen Zellen und Zellkompartimenten wie Plasmamembran, Zellkern und Zytoplasma. Anschließend konzentriert sich die Diskussion auf die Besonderheiten des konservierten C-Terminus der RS1-Proteine (UBA-Domäne). Nach Abhandlung dieser mehr allgemeinen Charakteristika des RS1 werden die möglichen Funktionen des RS1-Proteins unter Einbezug der subzellulären Verteilung erörtert. Hierbei eröffnet sich die Vorstellung von RS1 als Signalmolekül zwischen Plasmamembran und Zellkern. Abschließend werden die gesammelten Daten in einem hypothetischen Modell zusammengefasst, welches viele Ansätze für weitere prüfende Experimente zum RS1 liefert.

5.1 pRS1-Detektion im Westernblot

Für den Nachweis des pRS1-Proteins im Westernblot mit dem anti-RS1 Serum 33 ist es wichtig, dass die Proteine bei der Denaturierung für den SDS-PAGE mit β -Mercaptoethanol bzw. Dithiothreitol reduziert werden (Valentin et al., 2000). Dieser Hinweis wurde für die Optimierung der RS1-Detektion im Westernblot aufgegriffen und dahin weiter entwickelt, dass die Reduktion durch eine Alkylierung beständig blieb. Die Erhöhung der Empfindlichkeit beim RS1-Nachweis im Westernblot ist aller Wahrscheinlichkeit auf die Konformation der reduzierten pRS1-Proteine zurückzuführen. Es ist vorstellbar, dass die Zugänglichkeit von internen Epitopen für das anti-RS1 Serum 33_{IV}, welches gegen die gesamte RS1-Sequenz gerichtet ist, dabei begünstigt wird. Ob bei der Alkylierung die Reoxidation einer endogenen Disulfidbrücke, oder von unspezifischen und eventuell vorhandenen intermolekularen Disulfidbrücken verhindert wird, bleibt unbekannt. Zwar sind in den bekannten RS1-Proteinen aus dem Schwein, Menschen, Kaninchen und der Maus 3 konservierte Cysteine enthalten [Abb. 5-1], die sogar das Vorhandensein einer intramolekularen konservierten Disulfidbrücke vorstellbar machen, allerdings spricht die intrazelluläre Orientierung des RS1-Proteins und damit die reduzierenden Bedingungen im Zytosol gegen die Ausbildung einer internen Disulfidbrücke.

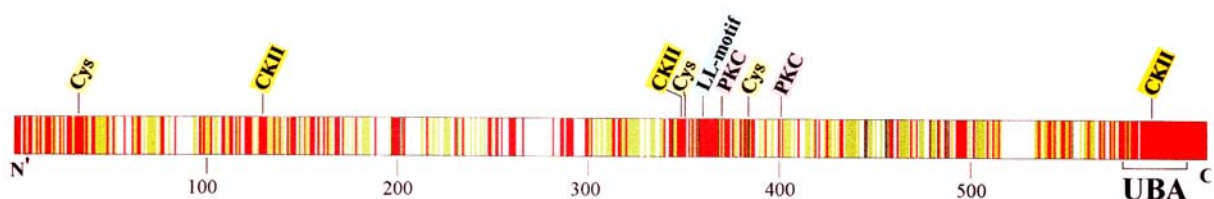


Abb. 5-1: Homologievergleich der RS1 Proteine aus Schwein, Mensch, Kaninchen und Maus

Rot: identische AS Grün: ähnliche AS

5.2 RS1 an der Plasmamembran

RS1 wurde als Plasmamembranprotein entdeckt (Veyhl et al., 1993) und seine Assoziation mit der Innenseite der Plasmamembran war durch Biotin-Markierungsexperimente an *Xenopus* Oocyten von Mark Valentin (1998) gezeigt worden. Das native pRS1-Protein kann am stärksten in den BBM-Vesikeln aus der Niere nachgewiesen werden. Auch bei den Zellen aus dem Dünndarm zeigte sich, dass das RS1-Protein in den BBM-Vesikeln stärker als in der Fraktion der angereicherten Plasmamembranen exprimiert ist [Abb. 4-2]. Aufgrund bisher fehlender geeigneter RS1-Antikörper bzw. deren fehlender Optimierung für die Immunhistochemie konnte die Lokalisierung an der Plasmamembran mikroskopisch noch nicht demonstriert werden. Erst nach Expression eines GFP-pRS1 Fusionsproteins in LLC-PK₁ Zellen war eine fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung an der Plasmamembran zu erkennen [Abb. 4-7]. Der dazugehörige Westernblot mit anti-GFP Serum zeigte eindeutig, dass das RS1-Protein für die Detektion des GFP-pRS1-Proteins in der Plasmamembranfraktion verantwortlich ist [Abb. 4-8].

Über die Art der Interaktion des RS1-Proteins mit der Plasmamembran ist noch nichts bekannt. Es ist eher unwahrscheinlich, dass RS1 über das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat an die Plasmamembran gelangt, da keine N-terminale Signalsequenz in der RS1-Aminosäuresequenz für einen Eintritt ins ER enthalten ist. Alternativ könnte RS1 aus dem Zytoplasma an die Zellmembran gelangt sein. Für eine Interaktion mit der Plasmamembran ist dann die Wechselwirkung mit einem anderen Membranprotein oder die kovalente Anheftung einer Fettsäure wie Myristin- oder Palmitinsäure vorstellbar. In der AS-Sequenz befindet sich von AS 24 bis 29 eine konservierte potentielle N-Myristylierungsstelle. Für eine erfolgreiche Myristylierung des RS1-Proteins stören allerdings die ersten 23 AS. Denn für den Transfer müsste der N-Terminus des Glycin (AS 24) zur Ausbildung einer Amidbindung mit der Myristinsäure frei sein. Somit wäre eine Myristylierung erst nach Abspaltung der 23 N-terminalen AS möglich.

Bei Analyse der RS1-Proteine in den BBM-Fractionen aus Dünndarm-Epithelzellen von Ratte, Schaf und in den angereicherten Plasmamembranfraktionen der LLC-PK₁ Zellen fiel auf, dass Faktoren wie Diabetes, Glucosekonzentration im Darmlumen und Zelldifferenzierungsgrad die Menge des RS1-Proteins an der Plasmamembran beeinflussen [Abb. 4-3, -4 und -5]. Bei einem vergleichenden Blick auf die Menge der SGLT1-Proteine in der Plasmamembran war kein einheitliches Verhalten feststellbar, denn es konnte sowohl eine ähnliche Wirkung, wie im Fall der Glucosewirkung im Schafsmodell, als auch ein reziprokes Auftreten von RS1 und SGLT1, wie beim Diabetes der Ratte oder Einfluss der

Zelldifferenzierung bei den LLC-PK₁ Zellen, beobachtet werden. Somit scheint auch die Vorstellung einer alleinigen Interaktion des RS1-Proteins mit der Plasmamembran über das SGLT-Molekül eher unwahrscheinlich.

5.3 RS1 im Zellkern

Die ersten Hinweise, dass RS1 auch ein Protein des Zellkerns sein könnte, wurde bei Expression des Kaninchen-RS1 (rbRS1) in *Xenopus* Oocyten erhalten. 24 h nach Injektion der rbRS1-cRNA konnte Katharina Baumgarten in den Zellkernen ein 67 kD Fragment des rbRS1-Proteins entdecken (1999). Hingegen blieb das vollständige rbRS1-Protein in den Zellkernen nicht nachweisbar. Auch bei den nativen LLC-PK₁ Zellen konnte das vollständige pRS1-Protein nicht in den Zellkernen gefunden werden, aber es war ein 40 kD Signal mit dem affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum in der Zellkernfraktion detektierbar [Abb. 4-5]. Kontrollen zeigten, dass das 40 kD Signal nicht vom sekundären Antikörper stammte. Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das Kernsignal die Folge einer Kreuzreaktion mit einem anderen Kernprotein war, denn es muss berücksichtigt werden, dass das verwendete anti-RS1 Serum gegen die gesamte Sequenz des RS1 gerichtet war und dass so vielleicht auch Proteine mit ähnlichen Sequenzen bzw. Domänen (z.B. UBA Domäne anderer Kernproteine wie RAD23) ebenfalls mit detektiert wurden.

Die Kernlokalisierung des pRS1 war letztlich eindeutig nach Fusion mit GFP und anschließender Untersuchung im Westernblot und Fluoreszenzmikroskop demonstriert worden [Abb. 4-6, -7, -8 und -9]. Im Vergleich zu den nativen LLC-PK₁ Zellen war jedoch das vollständige GFP-pRS1 im Zellkern vorhanden. Hierfür sind verschiedene Gründe vorstellbar. Eventuell ermöglichte erst die Überexpression den Nachweis des vollständigen GFP-pRS1 im Zellkern oder die Fusion mit GFP hemmte sterisch eine proteolytische Spaltung des pRS1-Proteins. Leider bleibt die Frage offen, ob bei den nativen LLC-PK₁ Zellen das vollständige pRS1 in den Zellkern gelangt und dort schnell degradiert, oder ob nur ein Fragment des pRS1 in den Zellkern wandert.

Eine Sequenz aus einer Anhäufung basischer AS, welche als Kernlokalisierungssignal (NLS) gedeutet werden könnte (Kalderon et al., 1984), ist in der pRS1-AS-Sequenz nicht enthalten. Es ist deshalb möglich, dass pRS1 durch eine Interaktion mit einem NLS-tragenden Protein nach einem Huckepack Mechanismus trotzdem in den Zellkern gelangt (Dingwall et al., 1982; Zhao et Padmanabhan, 1988). Trunkierungsexperimente sollten klären helfen, ob überhaupt ein RS1-Fragment in den Zellkern gelangen kann und welche Bereiche im RS1 für die

Kernlokalisierung wichtig sind. Ein erster Hinweis für die geringere Bedeutung des N-Terminus für die Kernlokalisierung ergab sich daraus, dass ein 52 kD GFP-pRS1 Fragment im Zytoplasma auftauchte, das aber nicht im Zellkern akkumuliert wurde [Abb. 4-8]. Dieses Fragment enthielt rechnerisch ca. 25 kD vom N-Terminus des pRS1 (52 kD minus 27 kD des N-terminalen GFPs). Somit scheinen die ersten 25 kD (~230 AS) nicht für den Kernimport verantwortlich zu sein. Auch bei der Expression des GFP-pRS1 (AS 329-623) [Abb. 4-16, -20], welches wie das vollständige RS1 im Zellkern akkumuliert wird, zeigte sich, dass auf die N-terminale Hälfte (AS 1-328) für den Kernimport verzichtet werden kann.

Die Bedeutung des C-Terminus für den Kernimport deutete sich zuerst durch die verminderte Kernfluoreszenz bei Fusion des GFPs an den C-Terminus von pRS1 an [Abb. 4-13, -20]. Die Trunkierungen des pRS1(AS 1-623) um 42 AS am C-Terminus (AS 1-581) beeinträchtigte die Kernlokalisierung und es konnten vermehrt fluoreszenzfreie Zellkerne beobachtet werden [Abb. 4-19, -20]. Bei Trunkierung um 100 AS am C-Terminus war der Effekt auf die Kernlokalisierung noch deutlicher und es dominierten Zellen mit fluoreszenzfreien Zellkernen [Abb. 4-18, -20]. Das Auftreten noch vereinzelter Zellen mit Kernfluoreszenz könnte ein Zeichen dafür sein, dass ein unspezifischer Kernimport aufgrund der Überexpression nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, oder dass noch andere Faktoren wie z.B. Zellzyklus oder Zelldifferenzierungsgrad die Kernlokalisierung beeinflussen. Bei der Betrachtung der AS-Sequenz fällt auf, dass bei der C-terminalen Trunkierung um 42 AS die UBA-Domäne [AS 579-616] bis auf die ersten 3 AS verloren gegangen war. (Die mögliche Beteiligung der UBA-Domäne an der Kernlokalisierung wird gesondert unter Punkt 5.5 „Der C-Terminus des pRS1“ diskutiert.) Warum die Kernlokalisierung durch die weitere Trunkierung um 58 AS noch stärker gehemmt wurde, bleibt bisher unklar. Diese weitere Verkürzung fällt nämlich in einen Bereich der RS1-Sequenz, die eher durch eine geringe Homologie auffällt [Abb. 5-1]. Vielleicht liegt die Ursache weniger in dem Verlust der UBA-Domäne, als in der Veränderung der Gesamtkonformation des pRS1-Proteins, in dessen Folge die Interaktion mit Proteinen, die den Kernimport des pRS1 ermöglichen, erschwert wird.

5.4 RS1 im Zytoplasma

Bei den nativen LLC-PK₁ Zellen konnte das pRS1-Protein nicht im Zytoplasma detektiert werden [Abb. 4-5]. Weil pRS1 aber an der Plasmamembran und auch im Zellkern vorkommt, muss davon ausgegangen werden, dass zumindest geringe Mengen des pRS1-Proteins auch im Zytosol vorhanden sind. Es zeigte sich, dass bei Expression des pRS1 oder rbRS1 in

Xenopus Oocyten ein Großteil des RS1-Pools in der Zytoplasmafraktion auftauchte (Valentin, 1998) und auch bei Überexpression des GFP-pRS1 in LLC-PK₁ Zellen wurde das Protein vermehrt im Zytoplasma gefunden [Abb. 4-6, -8 und -9]. Über die Gründe für die starke Expression im Zytosol kann bisher nur spekuliert werden. Vielleicht ist die Anzahl der Möglichkeiten zur Verankerung des pRS1 an der Plasmamembran und im Zellkern so limitiert, so dass die restlichen pRS1-Proteine verstärkt im Zytosol verbleiben müssen. Oder für die Membran- und Kernlokalisierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung oder Myristilierung notwendig, die aber aufgrund der Überexpression nicht bei allen Proteine durchgeführt werden kann.

5.5 Der C-Terminus des pRS1

Beim Vergleich der RS1 Proteine untereinander fällt der C-Terminus durch die höchste Homologie auf [Abb. 5-1]. Die letzten 35 AS (pRS1: AS 588 bis 623) sind zu 100 % konserviert und deuten die Wichtigkeit dieser Region für die RS1 Proteine an.

Mit dem SMART Programm konnte das Motiv für eine UBA-Domäne in der AS-Sequenz des pRS1 von AS 579 bis 616 im C-Terminus entdeckt werden (Schultz et al., 1998). Aufgrund der hohen Homologie des C-Terminus ist die UBA-Domäne in allen RS1-Proteinen zu finden.

Die dreidimensionale Struktur der 2. UBA Domäne des humanen RAD23 Homologs HHR23A wurde mittels NMR Spektroskopie aufgeklärt. Die Domäne bildet eine sehr kompakte Struktur aus drei α -Helices [Abb. 5-2].

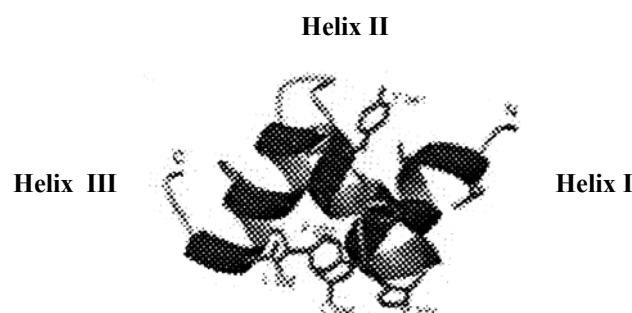


Abb. 5-2: Struktur der UBA Domäne aus HHR23A (aus Dieckmann et al., 1998)

Für die UBA-Domäne des humanen DNA Reparaturproteins HHR23A konnte gezeigt werden, dass die Konformation primär durch konservierte Helix-Helix Interaktionen bestimmt wird. Dabei spielen die hintereinander liegenden AS Glycin, Phenylalanin und Prolin (beim

RS1 Threonin) eine zentrale Rolle. Sie bilden einen Loop zwischen α -Helix 1 und 2. Die hydrophobe Seitenkette des Phenylalanins ermöglicht dabei eine Interaktion mit der 3. α -Helix, indem der Phe-Rest von den Methylgruppen zweier Leucinreste umgeben wird (Dieckmann et al., 1998). Diese konformationsentscheidenden Charakteristika sind konserviert im C-Terminus der bisher bekannten RS1-Proteine aus Schwein, Mensch, Kaninchen und Maus ebenfalls enthalten (Schultz et al., 1998).

```

AS 579 [----- UBA Domäne-----] AS 622
pRS1...  FPA A D  I DRI L R A GFTLQEALGALHRVGGNADLALLVLLAKNIVVP
hRS1.... FPA T D  I DRI L R AGFTLQEALGALHRVGGNADLALLVLLAKNIVVP
rRS1.... FPA A D  I DRI L R AGFTLQEALGALHRVGGNADLALLVLLAKNIVVP
mRS1..   FPA A D  V DRI L G AGFTLQEALGALHRVGGNADLALLVLLAKNIVVP
HHR23A  QEK E A  I ERL K A LGFPE SLVI QAYFAC EKNENLAANFLLSQNFDD
          [--- $\alpha$ -Helix I--]      [--- $\alpha$ -Helix II---]      [----  $\alpha$ -Helix III---]

```

Abb. 5-3: Vergleich der UBA-Domäne aus den RS1-AS-Sequenzen mit der 2. UBA aus HHR23A
Die angegebenen Positionen der α -Helices wurden aus dem Sequenzvergleich mit der bekannten Konformation der UBA-Domäne aus HHR23A abgeleitet (Dieckmann et al., 1998.). Vergleich mit HHR23A-Sequenz: *rot*: identische AS; *blau*: ähnliche AS

Bei der C-terminalen Trunkierung um 42 AS wurde die UBA-Domäne bis auf die ersten 3 AS entfernt. Diese Trunkierung behinderte die Kernlokalisierung des GFP-pRS1 (AS 1-581), bei 70 % der Zellen deutlich, konnte aber die Kernlokalisierung nicht vollständig aufheben. Da die Kernlokalisierung des pRS1 durch die Trunkierung der UBA-Domäne nicht komplett aufgehoben werden konnte, könnte es sein, dass die UBA-Domäne für den Kernimport nicht alleine zuständig ist. Vielleicht wirkt die UBA-Domäne nur indirekt auf den Kernimport, so dass z.B. ohne die UBA-Domäne eine posttranslationale Modifikation, die den Kernimport steuern könnte, nicht mehr möglich ist.

UBA-Domänen konnten in bisher 116 verschiedenen Proteinen entdeckt werden, wobei 40 Beispiele aus Säugern stammen (Schulz et al., 1998). Unter diesen Proteinen sind auch Kernproteine wie die RAD23-Homologen. Das RAD23 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ein DNA-Reparatur-Protein, welches durch DNA-schädigende Reagenzien reguliert wird (Watkins et al., 1993). Eine Bedeutung dieses Motivs für den Kernimport ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es ist aber vorstellbar, weil das pRS1-Protein mit Ubiquitin interagieren kann, dass RS1 durch Interaktion mit einem ubiquitinierten Kernprotein, wie einem Transkriptionsfaktor oder einem Chromatinprotein in den Zellkern gelangt.

Eine andere Möglichkeit den Einfluss des C-Terminus auf den Kernimport zu erklären, bildet die Existenz einer konservierten potentiellen Phosphorylierungssequenz im C-Terminus (pRS1: AS 592) für die Caseinkinase II (Baumgarten, 1999). Eine Caseinkinase II abhängige Phosphorylierung des rekombinanten pRS1 konnte *in vitro* demonstriert werden [Abb. 4-35]. So ist z.B. bekannt, dass die Caseinkinase II abhängige Phosphorylierung des SV40-T-ag (simian virus 40 large tumor antigen) und des Nukleoplasmins aus *Xenopus* den Kernimport beschleunigt (Rihs und Peters, 1989; Vacurova et al., 1995).

5.6 Die möglichen physiologischen Funktionen des RS1

5.6a Wirkung an der Plasmamembran

Die ersten funktionellen Hinweise ergaben sich aus der Koexpression des RS1 gemeinsam mit dem SGLT1 in *Xenopus* Oocyten (Spangenberg et al, 199; Veyhl et al., 1993; Lambotte et al., 1996). Später konnte bei Koexpression auch für den hOCT2 eine Veränderung des V_{\max} – Wertes gemessen werden (Reinhardt et al., 1998). Somit ist der Effekt des RS1 nicht für den SGLT1 spezifisch. Die Ursache für die Hemmung des Transportes in *Xenopus* Oocyten kann aufgrund der Injektion von cRNA als transkriptionsunabhängig angesehen werden, was durch zusätzliche Versuche mit dem Transcriptionshemmer Actinomycin D bestätigt werden konnte (Veyhl, persönliche Mitteilung 1999).

In *Xenopus* Oocyten wurde gezeigt, dass sich die Menge des hSGLT1 in der Plasmamembran nach Koexpression mit dem hRS1 proportional zur Abnahme der Transportleistung verringert. Gleichzeitig konnte eine Abnahme der Membrankapazität gemessen werden, die sich elektronenmikroskopisch durch eine Verringerung der Oocytenoberfläche erklären ließ (Valentin et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die durch RS1 induzierten Veränderungen der Plasmamembranoberfläche könnten Einflüsse auf die Endo- bzw. Exozytoseraten sein. Hierzu wurden Versuche mit dem Membran-Farbstoff RH 414 durchgeführt, welcher nur durch die Internalisierung von Plasmamembran ins Zellinnere gelangen kann. Die erhöhte Aufnahme des RH 414 von den pRS1 stabil überexprimierenden Zellen lässt eine Wirkung des pRS1 auf die Endocytose als Ursache vermuten [Abb. 4-32].

Die Endozytose von Plasmamembranproteinen wird durch kurze AS-Sequenzen im zytoplasmatischen Anteil dieser Membranproteine vermittelt, die mit einer Translokation der Membranproteine in die sogenannten Coated pits beginnt. Ein wichtiges Endozytose-Signal stellt das Di-Leucin Motiv dar, welches z.B. beim Insulin-Rezeptor (Haft et al. 1998) und im Glut 4 (Garippa et al. 1996) eine Translokation in die Coated pits verursacht. So ein Di-

Leucin Motiv kommt auch im RS1 (pRS1 AS 366/67) vor und zwar befindet es sich in einer zu 100% konservierten Sequenz aus 10 AS (pRS1 AS 359-668).

AS 357	AS 371
pRS1 S I TAALKELHELLV I SS	
hRS1 S I TAALKELHELLV V SS	
rbRS1 S I TAALKELHELLV I SS	
mRS1 <u>S</u> V <u>TAALKELHELLV</u> I <u>SS</u>	

Abb. 5-4: Di-Leucin Motiv im RS1

Auch das Tyrosin-based Yxx \otimes Motiv (\otimes : AS mit einem großen hydrophoben Rest) ist ein bekanntes Endozytose-Motiv und ermöglicht z.B. die Internalisierung des LDL- (Chen et al. 1990) und des Transferrin-Rezeptors (Colloawn et al., 1990). Dieses Motiv kommt in der AS-Sequenz des RS1 allerdings nicht vor. Das Tyrosin-based sowie das Di-Leucin Motiv ermöglichen beide eine Interaktion mit dem Clathrin-Adapter Komplex AP-2, welcher eine Translokation in die Clathrin-umkleideten Coated pits bewirkt (Marks et al., 1997; Trowbridge, 1991).

Auch die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen kann als Endozytose-Signal dienen (Straus and Goivers, 1999; Hicke, 1999). Während die Bildung von Polyubiquitinketten zur Erkennung und Degradation durch das Proteasom führt, kann die Monoubiquitinierung eines Membranproteins dagegen die Internalisierung initiieren (Terrell et al., 1998; Shih et al., 2000; Lucero et al., 2000). Wie wichtig die Ubiquitinierung für die Endozytose eines Membranproteins sein kann, konnte an einer Mutation im epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC) erkannt werden. Eine Mutation im PPxY-Motiv verhindert eine Interaktion mit der WW-Domäne der membranassoziierten Ubiquitin-Ligase Nedd4 (Staub et al., 1997), so dass in Folge der ENaC nicht ubiquitiniert wird. Die fehlende Ubiquitinierung verursacht eine verstärkte Präsenz des ENaCs (Schild et al., 1996; Shimkets et al., 1997) und damit eine erhöhte Aktivität des ENaC. Das dadurch verursachte erbliche Krankheitsbild ist unter dem Namen Liddle's Syndrom bekannt und führt zu einem arteriellen Überdruck, denn der ENaC ist beteiligt an der Resorption von Salz und Flüssigkeit aus dem distalen Nephron, Dickdarm und Lungenepithel.

Wie die Ubiquitinierung eines Plasmamembranproteins die Internalisierung initiiert, ist noch unverstanden. Die einfachste Erklärung wäre, wenn ein Protein-Adapter eine Verbindung zwischen den ubiquitinierten Plasmamembranproteinen und der Endozytose-Maschinerie herstellen könnte (Hicke, 1999; Strous and Govers, 1999; Rotin et al., 2000; Shih et al.,

2000). Dieser Adapter würde eine wichtige Rolle für die ubiquitinabhängige Endocytose spielen. RS1 könnte ein Kandidat für die Funktion dieses gesuchten Protein-Adapters in der ubiquitinabhängige Endozytose sein, denn:

1. pRS1 ist ein membranassoziiertes Protein (Valentin et. al., 2000)
2. pRS1 besitzt eine aktive UBA-Domäne, welche eine nicht kovalente Interaktion mit Mono-Ubiquitin ermöglicht (4.4)
3. RS1 besitzt ein konserviertes Di-Leucin Endozytose Motiv (pRS1 AS 366/67)
4. pRS1 scheint endozytotische Vorgänge zu fördern (4.6 und Valentin et al., 2000)
5. RS1 wirkt auf verschiedene Transporter wie den SGLT1 und den OCT2 (Reinhardt et al., 1999)

5.6b Funktion im Zellkern

Bei Reduzierung der Translation des endogenen pRS1 mittels einer stabilen anti-sense Strategie in LLC-PK₁ Zellen wurde eine drastische Erhöhung der Transcription des SGLT1 gemessen (Korn, 1999; Track, persönl. Mitteilung, 2000). Bei der Überexpression des pRS1 in LLC-PK₁ Zellen konnte genau der gegenteilige Effekt und zwar die Reduzierung der SGLT1-mRNA beobachtet werden [Abb. 4-31]. Dieser Befund verdeutlicht, dass RS1 repressorisch auf die Transcription des SGLT1 in LLC-PK₁ Zellen wirkt.

Da gezeigt werden konnte, dass RS1 in den Zellkern gelangen kann, ist es wahrscheinlich, dass RS1 seine Wirkung auf die Transcription im Zellkern entfaltet. Im Kern interagiert RS1 wahrscheinlich nicht direkt mit der DNA, denn es konnten keine bekannten DNA-Interaktionsmotive in der Sequenz von RS1 nachgewiesen werden. Deshalb ist anzunehmen, dass RS1 indirekt durch Interaktion mit anderen Transcriptionfaktoren auf das SGLT1-Gen wirkt. Dabei wäre auch eine Beteiligung der UBA-Domäne vorstellbar, auch wenn eine direkte transcriptionsregulierende Rolle einer UBA Domäne bisher noch nicht beschrieben worden ist. Theoretisch ist möglich, dass das RS1-Protein über eine Interaktion mit z.B. einem ubiquitinierten Transcriptionfaktor oder einem ubiquitinierten Chromatinprotein indirekt auf die Transcription des SGLT1 wirkt. Welche DNA-Proteine direkt die Transcription des SGLT1 reprimieren, ist bisher kaum untersucht worden. Wood und Mitarbeiter (1999) konnten aber zeigen, dass es in der Promotorregion des sSGLT1 ein oder vielleicht auch zwei Bereiche für eine transkriptionelle Suppression gibt. Die transcriptionsregulierende Regulation des SGLT1 ist bei weitem noch nicht verstanden und lässt viel Spielraum für noch unbekannte Regulationsmechanismen, an denen eventuell RS1 beteiligt sein könnte.

Bei der Transkriptionskontrolle des SGLT1 in den LLC-PK₁ Zellen ist zu beachten, dass die Transcription des endogenen SGLT1 auf noch unbekannte Weise auch durch die Ausbildung der Zell-Zellkontakte reguliert wird. Erst bei konfluenten Zellen kommt es zur Transcription des SGLT1 (Shioda et al., 1994; Suzuki et al., 1996). Bei Störung dieser Zell-Zellkontakte wird die SGLT1-Transkription schnell wieder reduziert (Van der Bosch et al., 1991). Es muss also in den LLC-PK₁ Zellen ein Signalweg von der Plasmamembran in den Zellkern existieren. Sollte RS1 diesen Signalweg z.B. durch Beeinflussung der Zellkontakte (Tight junctions) beeinflussen oder an einer anderen Stelle in diesen Signalweg eingreifen, so wäre ein transcriptioneller Einfluss des RS1 sogar ohne eine direkte Kernlokalisierung des RS1 vorstellbar.

5.7 Ist RS1 ein Signaltransduktionsprotein?

Die Verteilung des pRS1 an der Plasmamembran und im Nukleus erinnert an das Verhalten eines Signaltransduktionsproteins, welches ähnlich wie z.B. das β -Catenin bei der Zelldifferenzierung ein Signal von der Plasmamembran in den Zellkern trägt. Auch β -Catenin wurde zuerst als reines membranständiges Protein beschrieben, welches die Zell-Zelladhäsionsproteine Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle verbindet (Peifer, 1995). Ähnlich dem pRS1 konnte β -Catenin erst nach Überexpression im Zytoplasma und im Zellkern entdeckt werden (Hinck et al., 1994). Im Zellkern wirkt β -Catenin auf die Transcription durch eine Interaktion mit den Transcriptionfaktoren der LEF/TCF Familie (Molenaar et al., 1996; Behrens et al., 1996).

Der konfluenzabhängige Nachweis des RS1-Proteins an der Plasmamembran der LLC-PK₁ Zellen [Abb. 4-5] lässt Parallelen zum Verhalten des Zonula occludens-1 Proteins (ZO-1) erkennen, welches zur Familie der membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) gehört (Gottardi et al., 1996). ZO-1 verhält sich allerdings umgekehrt zum pRS1. Es ist nämlich vor Erreichen der Konfluenz im Zellkern und interagiert nach Erreichen der Konfluenz u.a. mit dem Transmembranprotein Occludin (Fanning et al., 1998).

Die Reduzierung der pRS1-Proteinmenge in der Plasmamembranfraktion der differenzierten LLC-PK₁ Zellen war nicht auf einen Rückgang der pRS1-mRNA zurückzuführen (Korn, 2000). Entweder ist die Translation des pRS1 nach Konfluenz negativ reguliert, oder, und dafür sprach das Auftreten des Kernsignals, es fand wie beim ZO-1 eine Umverteilung statt. Dabei ist vorstellbar, dass pRS1 entweder nach Translation direkt in den Zellkern gelangt, oder dass eine vorherige Membranassoziation notwendig ist. Das Auftreten eines 60 kD

Fragmentes in der Plasmamembran und anschließend eines 40 kD Fragmentes im Zellkern deuten eher einen Weg von der Plasmamembran in den Zellkern an [Abb. 4-5]. Die Minderung des RS1 an der Plasmamembran nach Konfluenz könnte dann mit einer Regulation durch Degradation erklärt werden. Ob die detektierten Fragmente Produkte einer physiologischen Spaltung sind, die mit dem Mechanismus des RS1 verbunden sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Das Entstehen eines etwa 60 kD Fragmentes konnte aber auch bei den Duodenummembranen [Abb. 4-2] und bei der *in vitro* Expression des pRS1 in Reticulocyten-Lysat gesehen werden [Lambotte et al., 1996].

Theoretisch befindet sich eine trypsinsensitive Schnittstelle im 2. großen konservierten Abschnitt [Abb. 5-1; AS 359–368]. Eine Proteolyse in diesem Bereich würde das Protein in ein 3/5 und 2/5 Fragment teilen, was nach dem Laufverhalten im SDS-PAA-Gel ein 60 und 40 kD Fragment ergäbe.

5.8 Ein hypothetisches Modell zum Wirkmechanismus des RS1

Die subzellulären Lokalisierungsergebnisse des pRS1 und die funktionellen Hinweise zur Endozytose und transcriptionellen Repression des SGLT1 sind in einem hypothetischen Modell zusammengefasst worden. Die Hinweise zur physiologischen Spaltung des pRS1-Proteins erscheinen noch zu spekulativ und sind aus diesem Grund nicht verarbeitet worden. Das Modell lehnt sich an ein früheres Modell an (Korn, 1999), in welchem die Wirkung des RS1 auf verschiedene Transportproteine durch die Einführung eines noch unbekanntes Adapter-Proteins erklärt wurde [Abb. 2-1]. Auch die Vorstellung von RS1 als Signalmolekül, welches ein Signal von der Plasmamembran in den Zellkern trägt, wurde mit einbezogen.

Im Modell [Abb. 5-5] ermöglicht die UBA-Domäne des RS1 die Erkennung eines ubiquitinierten Plasmamembranproteins, wie z.B. des SGLT1. Aufgrund des Di-Leucin Motivs im RS1 kommt es zur Erkennung und Interaktion mit dem AP-2 Clathrin-Adapter-Komplex (Trowbridge et al., 1991). Die Wechselwirkung mit AP-2 führt letztlich zur Lokalisierung des Proteinkomplexes in einem Clathrin umkleideten Coated pit.

Die Clathrin abhängige Abschnürung leitet die Internalisierung des ubiquitinierten Membranproteins ein. Nach dem Verlust der Clathrinhülle kann das Membranvesikel durch Membranfusionen in die frühen Endosomen und weiter ins periphere und dann ins perinukleare Lysosom zur letztlichen Degradierung gelangen. Dieser Weg bis ins zellkern-

nahe Lysosom konnte bei der Aufnahme des Endocytosefarbstoff RH 414 gut beobachtet werden [Abb. 4-32].

Ein Teil der internalisierten Vesikel verbleibt zu einem frühen Zeitpunkt auch als Speicherpool im plasmamembrannahen Bereich und kann durch Fusion auch wieder an die Plasmamembran zurückgelangen. Dieser kurze Kreislauf an und direkt unter der Plasmamembran ermöglicht eine schnelle Rekrutierung und würde eine Erklärung für die intensive Anfärbung im Bereich der Zellperipherie mit RH 414 bei der pRS1 Überexpression liefern.

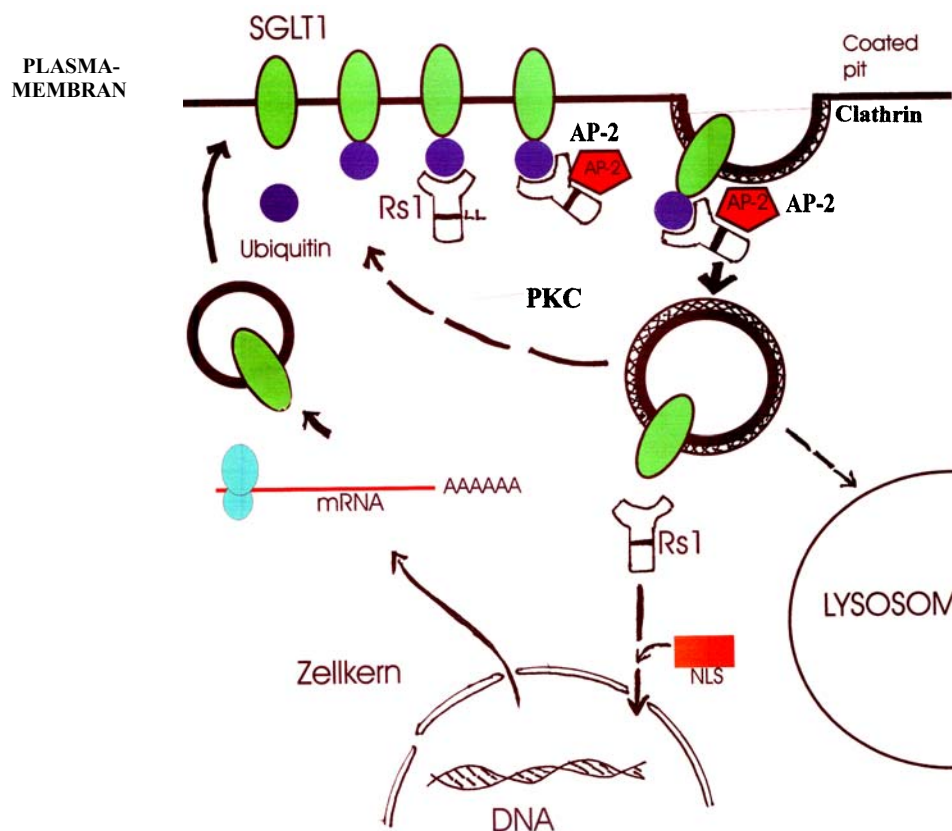


Abb. 5-5: Hypothese zur Funktion des RS1

Günes Oval: SGLT1; **blauer Kreis:** Ubiquitin; **rotes Fünfeck:** Clathrin-Adapter Komplex AP-2; **rotes Viereck:** Protein mit NLS-Sequenz für Kernimport; **farblose Y-Form:** RS1; **PKC:** Proteinkinase C

Für den Kernimport des RS1 muss die Hilfe eines anderen Proteins vermutet werden, da RS1 selber keine NLS besitzt. Im Zellkern wirkt RS1 dann auf unbekannte Weise negativ regulierend auf die Transcription des SGLT1 (5.6b).

Eine mit der Endozytose von Plasmamembranproteinen verbundene Transcriptionshemmung von Plasmamembranproteinen erscheint physiologisch sinnvoll. RS1 wäre somit im Modell auch ein Signaltransduktionsprotein, welches eine mittelfristigen Regulation durch

Endozytose mit einer längerfristigen Regulation durch Transcriptionshemmung koppeln würde.

Ein zentraler Punkt und auch Voraussetzung für dieses Modell ist die Ubiquitinierung des SGLT1 an der Plasmamembran. Diese Ubiquitinierung des SGLT1 ist bisher noch nicht bedacht und deshalb noch nicht gezielt untersucht worden. Alle SGLT1 Proteine besitzen aber 6 konservierte Lysinreste auf der zytoplasmatischen Seite (nach dem Topologiemodell von Turk et al., 1996), an denen eine Ubiquitinierung möglich wäre. Die Ubiquitinierung von Plasmamembrantransportern könnte z.B. durch die membranassoziierte Ubiquitin-Ligase Nedd4 erfolgen, welche mit PPxY Motiven interagiert (Rotin et al., 2000). Vielleicht ermöglicht die konservierte MPEY Sequenz auf der zytosolischen Seite zwischen der Transmembranhelix 3 und 4 im SGLT1 auch eine Interaktion mit Nedd4, so dass eine Ubiquitinierung des SGLT1 stattfinden könnte.

5.9 Die möglichen Regulationen der RS1-Aktivität

Um die postulierten unterschiedlichen Funktionen von RS1 im Modell (5.8) an der Plasmamembran und im Zellkern erfüllen zu können, müssten wechselnde Affinitäten des RS1-Proteins zu unterschiedlichen Interaktionspartnern verlangt werden. Diese Anforderungen könnten durch posttranslationale Modifikationen erfüllt werden.

5.9a Der Einfluss der Kinasen

Der Erfolg einer *in vitro* Phosphorylierungen hängt entscheidend von der Möglichkeit einer konformationsabhängigen Interaktion zwischen der Kinase und dem Testsubstrat und von der Zugänglichkeit der Phosphorylierungssequenz im Testsubstrat ab. Im Fall des rekombinanten pRS1-Proteins konnten diese beiden Bedingungen bei Inkubation mit der PKA, PKC und CaK II erfüllt werden (4.7).

Es fällt auf, dass sich die konservierten Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe zur UBA-Domäne und dem Di-Leucin Motiv befinden [Abb. 5-1]. Somit ergibt sich Möglichkeit, dass eine Phosphorylierung im Bereich dieser Sequenzen die Aktivität dieser Motive regulieren könnte.

Die 3 konservierten potentiellen Phosphorylierungssequenzen für die Casein Kinase II befinden sich dabei im N-Terminus (AS 130) in der Mitte (AS 348) und im C-Terminus (AS 592) des pRS1 und scheinen so die Konformation des RS1 in allen Bereiche beeinflussen zu können. Besonders interessant ist dabei die Möglichkeit einer Regulation der Aktivität der

UBA-Domäne für eine Interaktion mit Ubiquitin durch die CaKII. Auch das Di-Leucin Endozytose-Motiv könnte durch eine Casein Kinase II abhängige Phosphorylierung reguliert werden. So ist z.B. bekannt, dass die Aktivität der Caseinkinase II die Endozytose des Transferrin-Rezeptors reguliert. (Cotlin et al., 1999). Ebenso könnte die Caseinkinase II abhängige Phosphorylierung auch für den Kernimport des RS1-Proteins wichtig sein, wie es z.B. für Nukleoplasmin aus *Xenopus* beschrieben ist (Vacurova et al., 1995).

Die Protein Kinase C abhängigen Konsensussequenzen befinden sich mehr in der Mitte der RS1-Sequenz (pRS1, AS 370 und 400) und könnten die Aktivität des Di-Leucin Endozytose Motivs (AS: 366/67) beeinflussen. Es ist bekannt, dass die PKC das Trafficking und Recycling des SGLT1 zwischen der Plasmamembran und dem intrazellulären SGLT1-Speichervesikel-Pool entscheidend mitreguliert, ohne dass eine direkte Phosphorylierung des SGLT1 involviert zu sein scheint (Wright et al., 1997; Hirsch et al., 1996; Delezay et al., 1994). Hier ergibt sich die Möglichkeit, dass dieser Vorgang durch die Phosphorylierung eines anderen für die Endozytose wichtigen Proteins wie vielleicht des RS1 vermittelt wird.

5.9b Proteolyse

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität von RS1 zu beeinflussen, könnten die gesammelten Hinweise zur Proteolyse des RS1 in ein 40 und 60 kD Fragment liefern [Abb. 4-5]. Eine Spaltung im Bereich des zweiten großen konservierten Bereiches [pRS1: AS 359-368] würde vielleicht die Präsentation des Di-Leucin Motivs beeinflussen und somit die Internalisierung auslösen. Es ist aber bisher unklar, ob die RS1-Spaltprodukte die Folge einer gezielten physiologischen Degradation sind und ob die Spaltprodukte dann aktive Effektoren sind.

Es gibt Beispiele verschiedener wichtiger Signalmoleküle, die durch eine Degradation reguliert werden, wie z.B. β -Catenin, NF- κ B und I κ B Proteine (Aberle et al., 1997; Fan and Maniatis, 1991; Chen et al., 1995).

5.10 Experimenteller Ausblick

Viele Arbeiten zur Regulation des Plasmamembrantransporters SGLT1 beschränken sich bei der Ursachenforschung aufgrund der Komplexität auf allgemeine Einflüsse bei der Transkriptionskontrolle oder nennen posttranscriptionale bzw. posttranslationale Ursachen, ohne Vorschläge für konkrete Mechanismen zu liefern. So sind viele Wirkungen wie z.B. der Proteinkinasen auch so vielfältig, dass ein genauer mechanistischer Vorgang bisher nicht vollständig nachvollzogen werden kann.

Für SGLT1 und RS1 ist nun ein Modell entwickelt worden, welches aufgrund der gefundenen Motive einem konkreten mechanistischen Vorschlag liefert. Diese Punkte müssten allerdings experimentell noch weiter erhärtet werden.

So ist ein zentraler Punkt und auch Voraussetzung für das Modell zur Wirkungsweise des RS1 (5.8) die Ubiquitinierung des SGLT1. Mit dem geschaffenen anti-pSGLT1 Serum 75 könnte eine Immunpräzipitation des SGLT1 versucht werden, um das Präzipitat dann auf Ubiquitin zu untersuchen. Hierfür würde die pRS1 anti-sense Zelllinie (Korn, 1999) aufgrund ihrer hohen SGLT1-Expression ein gutes Untersuchungsobjekt abgeben. Ein erster Hinweis würde sich aus dem Zuwachs des Molekulargewichtes des SGLT1-Proteins um 8.5 kD (MW des Ubiquitins) ergeben.

Zur Funktionsanalyse der UBA-Domäne sollte die physiologische Wirkung eines C-terminal trunkeierten pRS1 auf die Endozytose und die SGLT1-Transcription untersucht werden. Anstelle einer Trunkierung könnte auch Phenylalanin (AS 591) in der UBA-Domäne in eine Aminosäure mit einem geladenen Rest, wie z.B. in Aspartat mutiert werden.

Die Funktion des C-Terminus für die Kernlokalisierung könnte durch dessen Fusion mit GFP oder durch Fusion des C-Terminus mit einem zytosolischen Protein wie der Pyruvat-Kinase untersucht werden.

Ebenso sollte auch die Wirksamkeit des Di-Leucin Motivs (366/67) für die Funktion des pRS1 durch Mutation in diesem Motiv betrachtet werden.

Die Anreicherung bzw. Aufreinigung des endogenen pRS1 über eine Ubiquitin-Agarose liefert nun erstmals auch die Möglichkeit zur Klärung der Frage nach einer *in vivo* Phosphorylierung des RS1-Proteins. Die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die Funktion und Lokalisierung des RS1 sollten dann weiter durch Mutationen in den konservierten Phosphorylierungsstellen erforscht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A., Kemler R.** 1997. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasom pathway, *EMBO* **16**: 3797-04
- Amsler K., and Cook J.S.** 1982. Developmental Na-dependent hexose transport in a cultured line of porcine kidney cells. *Am. J. Physiol.* **242**: C94-C 101
- Amsler K., Ghatani S. and Hemmings B.A.** 1991. cAMP-dependent protein kinase regulated renal epithelial cell properties. *Am. J. Physiol.* **260**: C1290-C1299
- Avruch J., Zhang X.F. Kyriakis J.M.** 1994. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 279-283
- Baumgarten K.** 1999. Untersuchungen zu RS1, einem Regulator von Plasmamembrantransportern, *Dissertation, Universität-Würzburg*
- Behrens J., Kries J.P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W.** 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature*. **383**: 638-42
- Ben-Ze'ev A., Geiger B.** 1998. Differential molecular interactions of β -Catenin and plaktobilin in adhesion, signaling and cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 629-639
- Biber J., and Hauser H.** 1979. The role of SH-groups in the concentrative transport of D-glucose into brush border membrane vesicles. *FEBS Letters* **108**: 451-456
- Birnboim H.C. and Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Bonifacino JS,** 1998. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**: 19-57
- Bradbury N.A. and Bridges R.J.** 1994. Role of membrane trafficking in plasma membrane solute transport. *Am. Physiol. Soc.* **267**: C1-C24
- Bradford M.M.** 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Burant C.F., Flink S., DePaoli A.M., Chen J., Lee W.S., Hediger M.A., Buse J.B. and Chang E.B.** 1993, Small Intestine Hexose Transport in Experimental Diabetes. *J. Clin. Invest.* **93**: 578-585
- Chatterjee S. and Stochaji U.** 1998, Diffusion of Proteins across the nuclear envelope of HeLa cells, *BioTechniques*, **24**: 668-674
- Chen W.-J., Goldstein J.L., and Brown M.S.** 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails is required for coated pit-mediated internalization of LDL receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 3116-23

- Chen Z., Hagler J., Palombello V., Melandri F., Scherer D., Maniatis T.** 1995. Signal induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasom pathway. *Genes Dev.* **9**: 1586-97
- Chomczynski P. and Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:1 56-159
- Chow C.W., Khurana S., Woodside M., Grinstein S., Orlowski** 1999, The Epithelial Na⁺/H⁺ Exchanger, NHE3, Is Internalized through a Clathrin-mediated Pathway, *J. Biol. Chem.*, **53**: 37551-58
- Chung B.M., Wong J.K., Hardin J.A., Gall D.G.** 1999, Role of Actin in EGF-induced alterations enterocyte SGLT1 expression, *Am. Physiol. Soc.*, G463-69
- Ciechanover A., Hod Y., and Hershko A.** 1978. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 1100-05
- Clague M.J.** 1998. Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem. J.* **336**: 271-282
- Collawan J.F., Stangel M., Kuhn L.A., Esekogwu V., Jing S. Q. Trowbridge I.S. and Tainer J.A.** 1990. Transferrinreceptor internalisation sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**: 1061-72
- Cotlin L.F., Siddiqui M.A., Simpson F., Collawan J.F.** 1999, Casein Kinase II Activity Is Required for Transferrin Receptor Endocytosis, *J. Biol. Chem.*, **274**: 30550-56
- Creighton, T.E.** 1988. Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays*, **8**: 57-63
- Delezay O., Baghdiguian S., Fantini J.** 1993, The Development of Na⁺-dependent Glucose Transport during of an Intestinal Epithelial Cell Clone Is Regulated by Protein Kinase C, *J. Biol. Chem.*, **270**: 12536-12541
- Diekmann T., Withers-Ward E.S., Jarosinski M.A., Liu C.F.,Chen I.S. Feigon J.** 1998. Structure of a human DNA repair protein UBA domain that interacts with HIV-1 Vpr. *Nat. Struc. Biol.*, **5**: 1042-7
- Dingwall C. and Lasky R.A.** Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**: 478-481
- Doctor R.B., Dahl R.H., Salter K.D., Fouassier, Chen J., Fitz J.G.** 2000, ATP Depletion in Rat Cholangiocytes Leads to Marked Internalisation of Membrane Proteins, *Hepatology*, **5**: 1045-54
- Doye V., Hurt E.** 1997, From nucleoporins to nuclear pore complexes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**: 401-411
- Dyer J., Barker P.J. and Shirazy-Beechey S.P.** 1997. Nutrient intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) gene expression. *Biochem.Biophys. Res. Comm.* **230**: 624-629
- Dower W.J., Miller J.F., and Ragsdale C.W.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145

- Fan C.M. and Maniatis T.** 1991. Generation of p50 subunit of NF- κ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* **354**: 395-98
- Fanning A.S., Jameson B.J., Jesaitis L.A. and Anderson J.M.** 1998, The Tight junction ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton, *J. Biol. Chem.*, **273**: 29745-53
- Ferrari S.L., Behar V., Chorev M., Rosenblatt M., Bisello A.** 1999, Endocytosis of Ligand-Human Parathyroid Hormone Receptor 1 Complexes Is Protein Kinase C-dependent and involves β -Arrestin2, *J. Biol. J.*, **274**: 29968-29975
- Ferraris R.P., and Diamond J.F.** 1989. Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 125-141
- Ferraris R.P. and Diamond J.F.** 1997. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiological Rev.* **77**: 257-302
- Frasch W., Frohnert P.P., Bode F., Baumann K. and Kinne R.** 1970. Competitive inhibition of phlorizin binding by D-glucose and the influence of sodium: A study on isolated brush border membrane of rat kidney. *Pflugers Arch.* **320**: 265-84
- Garcia-Bustos J., Heitman J. and Hall M.N.** 1991. Nuclear protein localization. *Biochem. Biophys. Acta* **1071**: 83-101
- Garippa R.J., Judge T.W., James D.E. and McGraw T.E.** 1994. The amino terminus of GLUT4 functions as an internalisation motif but not an intracellular retention signal when substituted for the transferrin receptor cytoplasmatic domain. *J. Cell Biol.* **124**: 705-715
- Gitan R.S., Eide D.J.** 2000, Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter, *Biochem J.*, **346**(2): 329-336
- Girogino F., de Robertis O., Laviola L., Montrone C., Perrini S., McCoween K.C., Smith R.J.** 2000, The sentrin-conjugating enzyme UBC9 interacts with Glut4 and Glut1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **97** (3) 1125-30
- Gould G.W., Holman G.D.** 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.*, **295**: 329-41
- Gorboulev V., Büchner H., Akhoundova A., Fahrenholz F.** 1993. Molecular cloning and functional characterisation of V2 [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from pig kidney cell line. *Eur. J. Biochem.*, **215**: 1-7
- Gottardi C.J., Arpin M., Fanning A.S., Louvard D.** 1996, The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts, *C. Biol.* **93**: 10779-84
- Govers R., van Kerkhof P., Schwartz A.L., Strous G.J.** 1997, Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalisation of the growth hormone receptor. *EMBO J.* **16**: 4851-4858

- Govers R., ten Broeke T., van Kerkhof P., Schwartz A.L., Strous G.J.** 1999, Identification of a novel ubiquitin conjugation motif, required for ligand-induced internalisation of growth hormone receptor, *EMBO J.*, **18**(1): 28-36
- Gründemann D. and Koepsell H.** 1994. Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **216**: 459-461
- Haase W. and Koepsell H.** 1989. Electron microscopic immunohistochemical localisation of components of Na⁺-cotransporter along the rat nephron. *Eur. J. Cell Biol.* **48**: 360-74
- Haase W., Heitmann K., Friese W., Ohg D. and Koepsell H.** 1990. Characterization and histochemical localization of the rat intestinal Na⁽⁺⁾-Dglucose cotransporter by monoclonal antibodies. *Eur. J. Cell Biol.* **52**: 297-309
- Haft C.R., Sierra N.D.L. Hamer I., Carpentier J.I. and Taylor I.** 1998. Analysis of the juxtamembrane dileucine motif in the insulin receptor. *Endocrinology.* **139**: 1618-1629
- Hardin J., Kroeker K., Chung B., Gall D.** 2000, Effekt of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport, *Gut*, **47**: 184-191
- Harvey K.F., Kumar S.** 1999. Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular function. *Trends Cell Biol.* **9**(5): 166-9
- Hazzard C.E. and Ahearn G.A.** 1992. Rapid stimulation of intestinal D-glucose transport in teleosts by 17 α -methyltestosterone. *Am. J Physiol.* **262**: R412-R418
- Hediger M., Coady T.S. Ikeda and Wright E.M.** 1987: Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature.* **330**: 379-81
- Hediger M., and Rhoads D.B.** 1994. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* **74**: 993-1026
- Hemlin M., Huang X.** 1997, Na⁺/glucose cotransport in the colonic adenocarcinoma cell line HT29 cl.19A: effect of cAMP, *Acta Physiol. Scand.*, **160**: 185-194
- Hink L., Nelson W.J., Papkoff J.** 1994, Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilisation beta binding to the cell adhesion protein cadherin, *J. Cell Biol.* **124**: 729-741
- Hicke L.** 1999: Gettin`down with ubiquitin: turning of cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* **9**(3): 107-12
- Hirst J., Robinson M.S.,** 1998. Clathrin and adaptors, *Biochim.Biophys. Acta*, **1404**: 173-193
- Hirsch J., Loo D.D.F., Wright E.M.** 1996. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **271**:14740-14746
- Hofmann K., Bucher P.** 1996. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the Ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci.* **5**: 172-3

- Hull R.N., Cherry W.R. and Weaver G.W.** 1976. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK₁. *In Vitro* **12**: 670-677
- Iantomasi T., Favilli F., Marraccini P., und Vincenzini M.T.** 1998, Glutathione involvement on the intestinal Na⁺-dependent D-glucose transporter. *Mol. Cell. Biochem.* **178**: 387-392
- Ishikawa Y., Eguchi T., Ishida H.** 1997, Mechanism of β -adrenergic agonist-induced transmembrane transport of glucose in rat small intestine Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function, *Biochem. Biophys. Acta*, **1357**: 306-318
- Jacobson A.** 1987. Purification and fractionation of poly(A)⁺RNA. In: Methods in enzymology: guide to molecular cloning techniques. *Orlando Academic Press.* **152**: 254-261
- James D.E., Piper R.C. and Slot J.W.** 1994. Insulin stimulation of GLUT4 translocation: A model for regulated recycling. *Trends Cell Biol.* **4**:120-126
- Kalderon D.B., Roberts B.L., Richardson W.D. and Smith A.E.** 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear localization. *Cell.* **39**: 499-509
- Kimmich G.A., Randles J. and Wilson J.** 1994. Na⁺-coupled alanine transport in LLC-PK₁ cells. *Am. J. Physiol.* **267**: C1119-C1129
- Koepsell H., H. Menuhr, I. Ducis and T.F. Wissmuller.** 1983. Partial purification and reconstitution of the Na⁺-D-glucose cotransporter from pig renal proximal tubules. *J.Biol.Cem.* **258**: 1888-94
- Koepsell H. and Spangenberg J.** 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *J. Memb. Biol.* **138**: 1-11
- Korn T.** 1999. Ein neues Regulationsprinzip von Plasmamembrantransportern in der Schweinenierenepithelzelle LLC-PK₁ unter besonderer Berücksichtigung des Na⁺/Glucose Cotransporters SGLT1, *Dissertation Universität-Würzburg*
- Kurokawa T., Hashida F., Kawabata S., Ishibashi S.,** 1995, Evidence for the regulation of small intestinal Na⁺/glucose cotransporter by insulin, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**: 33-8
- Kyhse Andersen J.** 1984. Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacryl to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys Methods.* **10**: 203-9
- Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lambotte S., Veyhl M., Köhler M., Morrison-shetlar A.I., Kinne R.K.H., Schmid M. and Koepsell H.** 1996. The human gene of a protein that modifies Na⁺-D-glucose cotransport. *DNA and Cell Biology* **15**: 769-777
- Lanford R.E. and Butel J.S.** 1984. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T-antigen. *Cell.* **37**: 801-813

- Laroche E.** 1998, Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 in Caco-2 cells, *Biochem.*, **334**: 633-40
- Lee W.-S., Kanai Y., Wells R. and Hediger M.** 1994. The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **269**: 12032-12039
- Lescale-Matys L., Dyer J., Scott D., Freeman T.C., Wright E.M. and Shirazy-Beechey S.P.** 1993. Regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. *Biochem J.* **291**: 435-440
- Liakopoulos D., Doenges G., Matuschewski K., Jentsch S,** 1998, A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system, *Embo J.*, **17** (8) 2208-2214
- Lin J.T., Szwarc K., Kinne R. and Jung C.Y.** 1984. Structural state of the Na⁺/D-glucose cotransporter in calf kidney brush-border membranes. Target size analysis of Na⁺-dependent phlorizin binding and Na⁺-dependent D-glucose transport. *Biochem Biophys Acta.* **777**: 201-8
- Lock M., Greenberg M.E., Iafate A.J., Swigut T., Muench J., Kirchhoff F., Shohdy N. Skowronski J.** 1999, Two elements target SIV Nef to the AP-2 clathrin adaptor complex, but only one is required for the induction of CD4 endocytosis, *EMBO J.* **18**: 2722-33
- Loghman-Adham M.** 1991 Characterization of essential silydryl groups of rat renal Na⁺-Pi cotransporter. *Am. J Physiol.* **260**: F874-F882
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.L.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Lucero P., Penalver E., and Lagunas R.** 2000. Monoubiquitin is sufficient to signal internalisation of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**: 241-43
- Mahraoui L., Rodolosse A., Barbat A., Dussaulx E., Zweibaum A., Rousset M. and Brot-Laroche E.** 1994. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem J.* **298**: 629-633
- Marks M.S., Ohno H., Kirchhausen T. and Bonifacio.** 1997. Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefore. *Trends Cell Biol.* **7**: 124-128
- Martin M.G., Wang J., Solorzano-Vargas R.S., Lam J.T. Turk E., Wright E.M.** 2000, Regulation of the human Na⁺-glucose cotransporter gene SGLT1, by HNF1 and Sp1, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **278**: G591-603
- Massague J.** 1998. TGF- β Signal Transduction, *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 753-91
- Matosin-Matekalo M., Mesonero J.E., Delezay O., Poiree J.C., Ilundain A.A., Brot-Mauer H.R.** 1971. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis. De Gruyter, Berlin.
- McCrea P.D.** 1991, *Science*, **254**: 1359-1361

- Medintz I., Jiang H., Michels C.** 1998, The Role of Ubiquitin Conjugation in Glucose-induced Proteolysis of *Saccharomyces* Maltose Permease, *J. Biol. Chem.*, **51**: 34454-62
- Miller J.H., and Heath L.N.** 1989. Growth, enzyme activity, sugar transport, and hormone supplement responses in cells cloned from a pig kidney cell line LLC-PK₁. *J. Cell. Physiol.* **139**: 538-549
- Misteli L., Spector D.L.** 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology* **15**: **96** 1-964
- Mitchell P.J., Wang C. and Tjian R.** 1987. Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* **50**: 847-861
- Molenaar M., et al.** 1996 *Cell* **86**: 391-399
- Moran A.R., Turner J. and Handler J.S.** 1983. Regulation of sodium-coupled glucose transport by glucose in a cultured epithelium. *J. Biol. Chem.* **258**: 15087-15090
- Mullin J.M., Weibel J. and Kleinzeller A.** 1980. Sugar transport in the LLC-PK₁ renal epithelial cell line similar to mammalian kidney and the influence of cell density. *J. Cell. Physiol.* **104**: 375-389
- Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J.** 1994, A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem Biophys Methods.* **28**: 239-42
- Niles W.D., Malik A.B.** 1999, Endocytosis and Exocytosis Events Regulate Vesicle Traffic in Endothelial Cells, *J. Membrane Biol.*, **167**: 85-101
- Ohta T.K, Isselbacher J., and Rhoads D.B.** 1990. Regulation of glucose transporters in LLC-PK₁ cells: effects of D-glucose and monosaccharides. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6491-6499
- Peifer M.** 1995. *Trends Cell. Biol.* **5**: 224-229
- Penalver E., Lucero P., Moreno E., Lagunas R.** 1999, Clathrin and Two Components of the COPII Complex, Sec23p and Sec24p, Could be Involved in Endocytosis of the *Saccharomyces Cerevisiae* Maltose Transporter, *J. Bact.* **4**: 2555-2563
- Peng H. and Lever J.E.** 1995. Post-transcriptional regulation of Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) gene expression in LLC-PK₁ cells. *Biol. Chem.* **270**: 20536-20542
- Peng H. and Lever J.E.** 1995. Regulation of Na⁺-coupled transport in LLC-PK₁ cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 23996-24003
- Pessin J.E., Thurmond D.C. Elmendorf J.S., Cocker K.J. and Okada S.** 1999, Molecular basis of insulin stimulated GLUT4 vesicle Trafficking. *J. Biol. Chem.* **274**: 2593-96
- Peters, R.** 1986. Fluorescence microphotolysis to measure nucleocytoplasmic transport and intracellular mobility. *Biochem. Biophys. Acta* **864**: 305-359
- Pines J.** 1995. GFP in mammalian cells. *Trends Genet.* **11**: 326-327

- Poppe R., Karbach U., Gambaryan S., Wiesinger H., Lutzenburg M., Kraemer M., Witte O.W. and Koepsell H.** 1997. Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem.* **69**: 84-94
- Rachubinski R.A., Marcus S.L., Capone JP.** 1999, The p56^{lck}-interacting Protein p62 Stimulates Transkription via the SV40 Enhancer, *J. Biol. Chem.*, **274** (26): 18278-18284
- Ratna K., Valdlamundi, Insil Joung, Jack L. Strominger, and Jaekyoon Shin.** 1996 p 62, a Phosphotyrosin independent Ligand of the SH2 Domain of p56 , Belongs to a New Class of Ubiquitin-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 20235-37
- Reed K.C., and Mann D.A.** 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acids Res.* **13**: 7207-7221
- Reinhardt J.** 1996. Klonierung und Charakterisierung eines Membran-assoziierten Proteins aus dem Kaninchendünndarm mit modifizierenden Eigenschaften auf den Na⁺-abhängigen D-Glucosecotransporter. *Dissertation*, Universität-Frankfurt
- Reinhardt J., Veyhl M., Wagner K., Gambaryan S., Dekel C., Akhoundova A., Korn T. and Koepsell H.** 1999. Cloning and characterization of the transport modifier RS 1 from rabbit which was previously assumed to be specific for Na⁺-Dglucose cotransport. *Biochim Biophys. Acta* **1417**: 13 1-143
- Rickwood, D.** 1984. Centrifugation. A practical approach. 2nd ed. IRL Press, Oxford
- Rihs H.-P., and Peters R.** 1989. Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simian virus 40 T-antigen. *EMBO J.* **8**:1479-1484
- Rihs H.-P., Jans D.A., Fan H. and Peters R.** 1991. The rate of cytoplasmic protein transport is determined by a casein kinase II flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *Embo J.* **10**: 633-639
- Roberts B., Richardson W.D., Smith A.E.** 1987. The effect of protein context on nuclear location signal function. *Gell* **50**: 465-475
- Roberts B.** 1989. Nuclear location signal-mediated protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1008**: 263-280
- Rosorius O., Heger P., Stelz G., Hirschmann N., Hauber J., Stauber R.H.** 1999, Direkt Observation of Nucleocytoplasmic Transport by Microinjektion of GFP-Tagged Proteins in Living Cells, *BioTechniques* **27**: 350-355
- Roth A.F, Davis N.G.** 1999, Ubiquitination of the PEST-like Endocytosis Signal of the Yeast α -Factor Receptor, *J. Biol. Chem.*, **11**: 8143-53
- Rotin D., Staub O., Haguenaer-Tsapis R.** 2000. Uiquitination of Plasma Membrane Proteins: Role of Nedd4/Rsp5p Family of Ubiquitin-Protein Ligases. *J. Membr Biol.* **176**(1): 1-17

- Roy S., Sala R., Caglio E., Lorenzi M.** 1990, Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: Phenomenon with a memory, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 404-8
- Rudolph R.** 1990. Renaturation of recombinant, disulfide-bonded proteins from inclusion bodies. In: Modern methods in protein chemistry. H. Tesche. de Gruyter, Berlin
- Salinovich O. and Montelaro R.C.** 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**: 341-347
- Salehzada I., Silhol M., Lebleu B. and Bisbal C.** 1991. Polyclonal antibodies against RNase L. *J Biol. Chem.* **266**: 5808-58 13
- Schild L., Lu Y., Gautschi I., Schneeberger E., Lifton R.P. and Rossier B.C.** Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.* **15**: 2381-2387
- Schultz J., Milpetz F., Brok P., Pointing CP.** 1998, „SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **95**: 5857-64
- Shih S.C., Sloper-Mould K.E., Hicke L.** 2000. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.*, **19** (29): 187-198
- Shimkets R.A., Lifton R.P. and Canessa C.M.** 1997. The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 25537-25541
- Shioda T., Ohta T., Isselbacher K.J., Rhoads D.B.** 1994. Differentiation dependent expression of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) in LLC-PK1 cells: role of protein kinase C activation and ongoing transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11919-11923
- Shirazy-Beechey S.P., Hirayama B.A., Wang Y., Scott D., Smith M.W., and Wright E.M.** 1991. Ontogenetic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet. *J. Physiol.* **437**: 699-708
- Spangenberg J., Veyhl M., Poppe R., Koepsell H.** 1993. Characterisation of the regulatory subunit of the Na⁺-D-glucose cotransporter. *Biol. Chem. Hoppe-seyler* **374**:157
- Stang E., Jhannessen L.E., Knardal S.L., Madshus I.H.** 2000, Polyubiquitination of Epidermal Growth Factor Receptor Occurs at the Plasma Membrane upon Ligand-induced Activation, *J. Biol. Chem.*, **18**: 13940-47
- Staub O., Dho S., Henry P.C. Correa J. Ishikawa T. McGlade J. and Torin D.** 1996. WW domains of Nedd4 bind to proline-rich PY motifs in the epithelial Na channel deleted Liddle's syndrome. *EMBO J.* **15**: 2371-80
- Staub O., Gautschi I., Ishikawa T., Breitschopf K., Ciechanover A., Schild L. and Rotin D.** 1997. Regulation of stability and function of the epithelial Na channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J.* **16**: 6325-6336

- Staub O., Abriel H., Plant P., Ishikawa T., Kanelis V., Saleki R., Horisberger J.D., Schild L., Rotin D.** 2000. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int.* **57** (3): 809-15
- Strous G.J., Govers R.** 1999. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J. Cell Sci.* **112**: 1417-1423
- Stümpel F., Scholtka B., Jungermann K.** 1998, Impaired glucose sensing by intrahepatic, muscarinic nerves for an insulin-stimulated hepatic glucose uptake in streptozotocin-diaetic rats. *FEBS Letters* **436**: 185-188
- Sundaram U., Coon S., Wisel S., West A.B.** 1999, Corticosteroids reverse the inhibition of Na⁺/glucose cotransport in the chronically inflamed rabbit ileum, *Am. Physiol. Soc.*, G221-218
- Suzuki T., Fujikura K., Takata K.** 1996, Na⁺-dependent glucose transporter SGLT1 is localized in the apicalplasma membrane upon completion of tight junction formation in MDCK cells, *Histochem. Cell Biol.*, **106**: 529-533
- Terrel J., Shih S., Dunn R. and Hicke L.** A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* **1**: 193-202
- Thevenod F., Friedmann J.** 1999, Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways, *FASEB J.* **13**: 1751-61
- Thrower J.S., Hoffmann L., Rechsteiner M., Pickart C.M.** 2000, Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *EMBO J.*, **19** (1) 94-102
- Trowbridge I.S.**,1991. Endocytosis and signals for internalisation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 634-641
- Turk E., Kerner C.J., Lostao M.P. and Wright E.M.** 1996. Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.* **271**: 1925-1934
- Turk E., Wright E.M.** 1997, Membrane Topology Motifs in the SGLT Cotransporter Family, *J. Biol. Chem.* **159**: 1-20
- Vacuova I., Paine T.M., Lou W., and Paine P.L.** 1995. Nucleoplasmnin associates with and is phosphorylated by casein kinase II. *J Cell Sci.* **108**: 779-787
- Valentin M.** 1998. Untersuchungen zur Funktion des Na⁺-D-Glucose Kotransporters SGLT1: Lokalisation in der Leber und Charakterisierung des regulierenden Proteins RS1. *Dissertation. Universität-Würzburg*
- Valentin M., Kühlkamp T., Wagner K., Krohne G., Arndt P., Baumgarten K., Weber W.-M., Segal A., Veyhl M. and Koepsell H.** 2000. The transport modifier RS1 is localized at the inner side of plasma membrane and changes membrane capacitance. *Biochim. Biophys. Acta.* **1468**: 367-80

- Veyhl M., Spangenberg J., Püschel B., Poppe R., Deckel C., Fritzsche G., Haase W., Koepsell H.**, 1993, Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter, *J. Biol. Chem.*, **268**: 25041-25053
- Van den Bosch L., de Smedt H., and Borghgraef R.** 1991. Influence of PMA and a low extracellular Ca²⁺ concentration on the development of the Na⁺-dependent hexose carrier in LLC-PK₁ cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1091**: 244-250
- Vayro S., Sivermann M.**, 1999, PKC regulates turnover rate of rabbit intestinal Na⁺-glucose transporter expressed in Coss-7 cells, *Am. J. Physiol.*, **276**: C1053-60
- You G., Lee W-S., Barros J.G., Kanai Y., Huo T-L., Khawaja S., Wells R.G., Nigam S.K., Hediger M.A.**, 1995. Molecular Characteristics of Na⁺-coupled Glucose Transporters in Adult and Embryonic Rat Kidney, *J. Biol. Chem.*, **270**: 29365-71
- Watkins J.F., Sung P., Prakash L. and Prakash S.** 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7757-65
- Westermeier R.** 1997. Electrophoresis in Practice, Second Edition. VCH
- Wood I.S., Allison G.G., Shirazi-Beechey S.P.**, 1999, Isolation and characterisation of a genomic region upstream from the ovine Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) cDNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**: 533-7
- Wright E.M., Hirsch J.R., Loo D.D.F.**, 1997. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.*, **200**: 287-293
- Wright E.M., Loo D.D., Panayotova-Heiermann M., Rayama B.A., Turk E., Eskandari S., Lamm J.T.**, 1998, Structure and function of the Na⁺/glucose Cotransporter, *A. Physio. Scand.*, **163**: 257-64
- Yet S., Kong C., Peng H., Lever J.**, 1994. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) mRNA in LLC-PK₁ cells. *J. Cell. Physiol.* **158**: 506-512

7. ANHANG

Die im Anhang aufgenommenen Daten zum RS1 beinhalten Versuche und Vorversuche, die wichtige Hinweise zum RS1 liefern, aber teilweise noch weiterer Klärung bedürfen.

7.1 Quantifizierung der pRS1-Konzentration in den BBM-Vesikeln aus der Niere

Nach der Optimierung der Detektionsbedingungen für das pRS1-Protein aus den BBM-Vesikeln der Schweineniere mit dem anti-RS1 Serum 33_{IV} im Westernblot (4.1) wurde die Menge des pRS1-Proteins in den BBM-Vesikeln durch Vergleich der Signalstärken mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten pRS1 abgeschätzt.

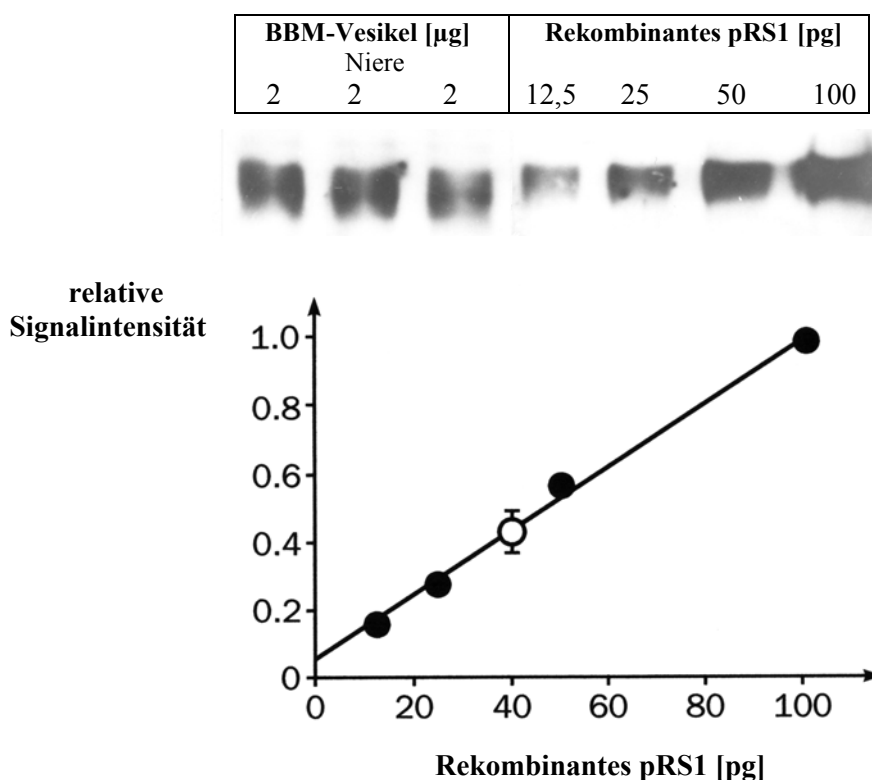


Abb. 7-1: Quantifizierung der pRS1-Konzentration in BBMV's aus der Schweineniere

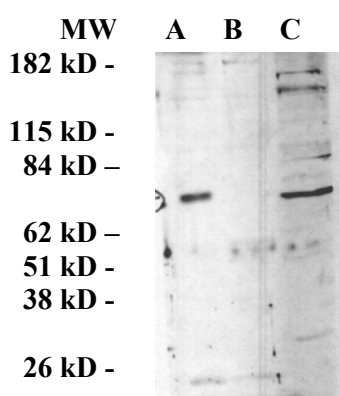
Drei mal je 2 μ g Nieren-BBMs und 12,5, 25, 50 und 100 pg des rekombinanten pRS1 wurden in Laemmli-Puffer denaturiert, mit Jodacetamid alkyliert und anschließend im SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 33_{IV} analysiert. Die RS1-Banden wurden densitometrisch nach Subtraktion des Hintergrundes mit Sigmascan (Sigma, Germany) ausgewertet. geschlossenes Symbol: rek. pRS1; offenes Symbol : 3 mal je 2 μ g BBMV (Niere)

Die Auswertung der drei pRS1-Banden aus je 2 μ g Nieren-BBMs ergab eine gemittelte densitometrische Intensität von 0,42 und entsprachen damit der Signalintensität von 40 pg des rekombinanten pRS1. In 1 mg BBM-Vesikeln ergaben sich somit 20 ng pRS1 (MW 68 kD), was 0,3 pmol pRS1 pro 1 mg Nieren BBMs entsprach. Für den SGLT1 konnte durch Phlorizinbindungsstudien mit BBMV's der Niere ein SGLT1-Gehalt von 50 bis 250 pmol pro

1 mg BBM-Nierenprotein bestimmt werden (Kinne, 1976; Koepsell et al. 1983). Somit lässt sich ein Verhältnis vom pSGLT1 zum pRS1 von ca. 1 : 150 bis 1 : 800 abschätzen. Damit musste eine frühere Quantifizierung (Valentin, 1998) mit einem postulierten Verhältnis von 1 : 3.000 um ca. den Faktor 10 korrigiert werden.

7.2 Kontrolle zur Trennung bei der Zellfraktionierung

Weil bei der Zellfraktionierung der LLC-PK₁ Zellen RS1-Signale auch in den Zellkernfraktionen [Abb. 4-5, -8 und -9] zu detektieren waren, war es wichtig auszuschließen, dass bei der Zellfraktionierung mittels differentieller Zentrifugation die gewonnene Zellkernfraktion mit Plasmamembranen kontaminiert war. Deshalb wurden die Kern- und Plasmamembranfraktionen im Westernblot mit einem anti-SGLT1 Serum analysiert [Abb. 7-2]. SGLT1 diene als Markerprotein für die Plasmamembran und sollte deshalb in der Kernfraktion nicht vorhanden sein.



A: BBM Schweineniere
B: Kernfraktion
C: Plasmamembranfraktion

Abb. 7-2 Westernblot: Überprüfung der Trennung von Kern- und Plasmamembranfraktionen

Die LLC-PK₁-Zellen wurden 5 Tage nach Erreichen der Konfluenz mittels differentieller Zentrifugation nach einer Methode von Salehzada et al. (1991) fraktioniert. Es wurden je 20 µg Kern- (1.200 g Sediment, gewaschen mit 0,5 % Igepal), 20 µg Plasmamembranfraktion (40.000 g Sediment) und als Positivkontrolle 20 µg BBM aus der Schweineniere aufgetragen und im Westernblot mit anti-SGLT Serum (SG11-A, Alpha Diagnostic, San Antonio, USA) analysiert.

Im Westernblot [Abb. 7-2] war das SGLT1 Protein als Bande bei 75 kD in der Probe der BBM-Vesikeln aus der Schweineniere (Spur A) und in der Plasmamembranfraktion der LLC-PK₁ Zellen (Spur C) zu erkennen. In der Proteinprobe der Kernfraktion der LLC-PK₁ Zellen (Spur B) war keine Reaktion mit dem anti-SGLT1 Serum feststellbar. Somit konnte eine stärkere Kontamination der Zellkernfraktion mit Plasmamembranen ausgeschlossen werden.

7.3 Stabilität der Kernfluoreszenz bei GFP-pRS1 Zellen nach Behandlung mit Triton

Die Stabilität der subzellulären Verteilung des GFP-pRS1 Proteins in den LLC-PK₁ Zellen wurde durch die Inkubation mit einem Detergenz überprüft. Auf diese Weise sollten Informationen über die Art und Stärke der Interaktion des GFP-pRS1 Proteins in der Zelle gewonnen werden.

Dazu wurden die Zellen 4 min bei 4°C in PBS mit 0,1 % Triton-100 auf einem Taumelschüttler inkubiert und anschließend in PBS umgepuffert.

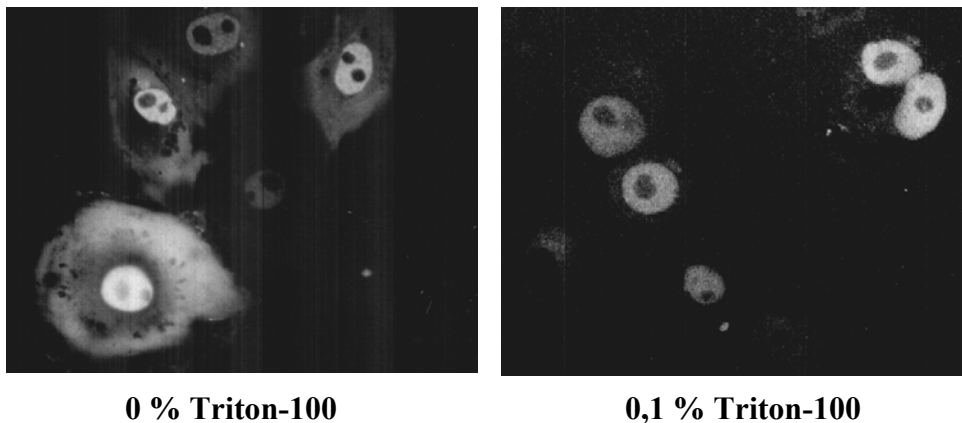


Abb. 7-3 Fluoreszenzbild: Stabilität der Kernfluoreszenz der pEGFP-RS1 LLC-PK₁ Zellen nach Inkubation in 0,1 % [v/v] Triton-100

Die GFP-pRS1 stabil exprimierenden Zellen wuchsen auf Deckgläschen und wurden bei 4°C 4 min mit 0,1 % [v/v] Triton-100 in PBS auf einem Taumelschüttler inkubiert und anschließend in PBS umgepuffert und sofort mikroskopiert.

Nach der Inkubation in 0,1 % Triton-100 war die vorher deutlich sichtbare zytoplasmatische Lokalisierung des GFP-pRS1 verschwunden [Abb. 7-3]. Das Kernsignal des GFP-pRS1 hingegen blieb auch nach der Triton-100 Behandlung unverändert und konnte nicht aus den Zellkernen extrahiert werden. Dieser Befund verdeutlichte die Unterschiede bei der Interaktionen des GFP-pRS1 im Zytosol und im Zellkern. Während die Tritonbehandlung die zytoplasmatische Lokalisierung aufhob, eventuell durch ein Ausfließen des löslichen GFP-pRS1 in Folge der Zerstörung der Plasmamembran, deutete die resistente Kernlokalisierung auf eine stärkere Interaktion des GFP-pRS1 mit Bestandteilen im Kerninneren hin.

7.4 Beobachtungen zur Regulation der Kernlokalisierung des GFP-pRS1(AS 1-581)

Nach der Trunkierung des pRS1 um 42 AS am C-Terminus und Fusion mit GFP waren Zellen mit und ohne Kernfluoreszenz zu beobachten (4.3). Die Ursache hierfür könnte vielleicht im Zellzyklus verborgen liegen.

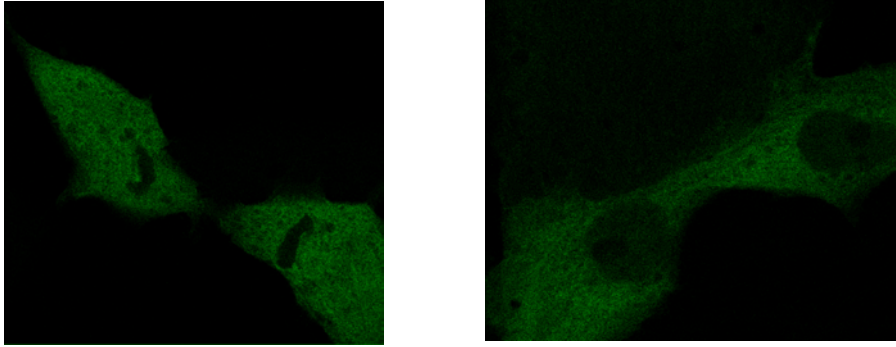


Abb. 7-4 Konfokale Laserscan-Aufnahmen: GFP-RS1 (AS 1-581) exprimierende Zellen

Die LLC-PK₁ Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pEGFP-pRS1(AS 1-581) mit 4% [v/v] Paraformaldehyd in PBS-Puffer fixiert und mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop bei Blaulichtanregung betrachtet.

Bei Zellen, die sich augenscheinlich unmittelbar nach einer Zellteilung befanden, blieben die Zellkerne fluoreszenzfrei [Abb. 7-4]. Es ist somit vorstellbar, dass die Kernlokalisierung des pRS1 von der Zellzyklus abhängigen Expression bzw. Aktivität noch unbekannter Faktoren mit beeinflusst wird.

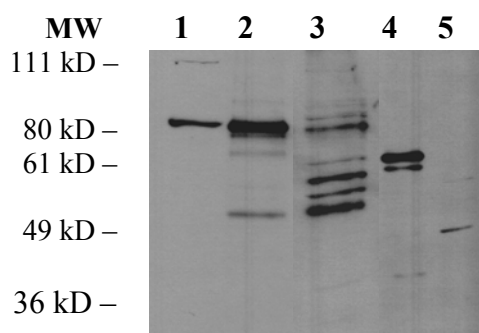
7.5 Expression des pRS1 (AS 1-512) in HEK Zellen

Um auszuschließen, dass die fehlende Kernlokalisierung des trunkierten GFP-pRS1 (AS 1-523) durch die Fusion mit GFP beeinflusst wurde [Abb. 4-17, -19], wurde ein C-terminal trunkiertes pRS1-Protein transient exprimiert und die Kernlokalisierung im anti-RS1 Westernblot untersucht. Dazu wurde das vollständige und ein trunkiertes pRS1-Gen (kodierte AS 1-512) in den pRc/CMV Vektor ligiert. Vorversuche zeigten, dass die transiente Expression in HEK Zellen größer als in LLC-PK₁ Zellen war.

Das pRS1-Protein ließ sich nach Transfektion in HEK-Zellen exprimieren und konnte im Zellhomogenat bei 100 kD auf der Höhe des pRS1-Proteins aus Nieren-BBMs detektiert werden [Abb. 7-5, Spur 1 und 2]. In der Zellkernfraktion (Spur 3) war das vollständige pRS1 (100 kD) und verschiedene Abbauprodukte in geringerer Konzentration ebenfalls vorhanden.

Das trunkierte pRS1 (AS 1-512) konnte nach Transfektion im HEK-Zellhomogenat als Bande bei 80 kD erkannt werden [Abb. 7-5, Spur 4]. In der Zellkernfraktion war das trunkierte pRS1-Protein hingegen nicht feststellbar (Spur 5).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Trunkierung des pRS1 am C-Terminus um 111 AS die Kernlokalisierung auch unabhängig von der GFP-Fusion behinderte.



Spur 1: 20 μ g Schweinenieren BBM (Positivkontrolle)

Spur 2: 20 μ g HEK-Zellhomogenat mit exprimiertem pRS1 (vollständig)

Spur 3: 20 μ g Zellkerne aus HEK-Zellen von Spur 2

Spur 4: 20 μ g HEK-Zellhomogenat mit exprimiertem pRS1 (AS 1-512)

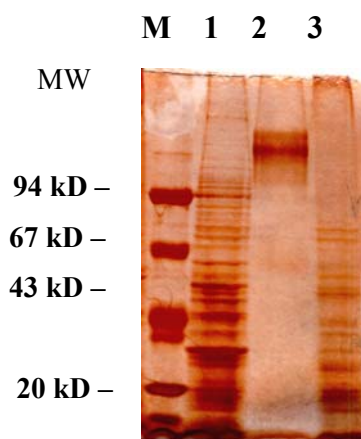
Spur 5: 20 μ g Zellkerne aus HEK-Zellen von Spur 4

Abb. 7-5 Störung der Kernlokalisierung des pRS1 nach C-terminaler Trunkierung um 111 AS

HEK-Zellen wurden mit *pRc/CMV-pRS1(AS 1-623)* bzw. *pRc/CMV-pRS1 (AS 1-512)* transfiziert und nach 48 h lysiert und anschließend mittels differenzieller Zentrifugation fraktioniert. Die Zellkernfraktion (1.200 g Sediment) wurde in 0,5 % [v/v] Igepal gewaschen. Der Westernblot wurde mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 33_{IV} analysiert.

7.6 *In vivo* Phosphorylierung des GFP-pRS1-Proteins

Die Frage nach einer möglichen *in vivo* Phosphorylierung des pRS1 war aufgrund bis dato fehlender Aufreinigungsmöglichkeiten des pRS1 schwierig. Weil mit dem polyklonalen anti-GFP Serum (Clontech) eine Immunpräzipitation (IP) des GFP-pRS1 möglich war [Abb. 7-6, Spur 2] wurde die Phosphorylierung in den GFP-pRS1 exprimierenden Zellen untersucht.



M: Größen-Marker

Spur 1: Zellhomogenat vor IP (8 μ g)

Spur 2: Immunpräzipitat (IP)

Spur 3: Zellhomogenat nach IP (8 μ g)

Abb. 7-6 Silbergefärbtes PAA-Gel: Immunpräzipitation des GFP-pRS1 Proteins

LLC-PK₁ Zellen, die GFP-pRS1 stabil exprimierten, wurden lysiert und nach 5 min bei 1.200 g wurde der Überstand (Homogenat) mit anti-GFP Serum (Clontech) inkubiert und mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Das Präzipitat wurde gewaschen und in Laemmli-Puffer denaturiert.

Das Immunpräzipitat aus dem Zellhomogenat der GFP-pRS1 exprimierenden LLC-PK₁ Zellen enthielt das GFP-pRS1 Protein, welches entsprechend seinem Molekulargewicht bei 130 kD lief [Abb. 7-6, Spur 2].

Nach Inkubation der GFP-pRS1 exprimierenden Zellen für 16 h mit ³²Phosphat und anschließender Immunpräzipitation aus dem Zellhomogenat mit dem anti-GFP Serum konnte jedoch kein autoradiographisches Signal des GFP-pRS1 im SDS-PAGE erkannt werden [ohne Abb.].

7.7 Anti-RS1 Seren

Für die Nachproduktion von weiteren anti-RS1 Seren wurden die Kaninchen Nr. 74 und 75 mit aufgereinigtem rekombinanten pRS1-Protein durch subskapuläre Injektionen immunisiert. Vom Serum der ersten Blutentnahme nach Beendigung des Immunisierungszyklus wurde der Titer gegen das rekombinante pRS1-Protein im ELISA bestimmt

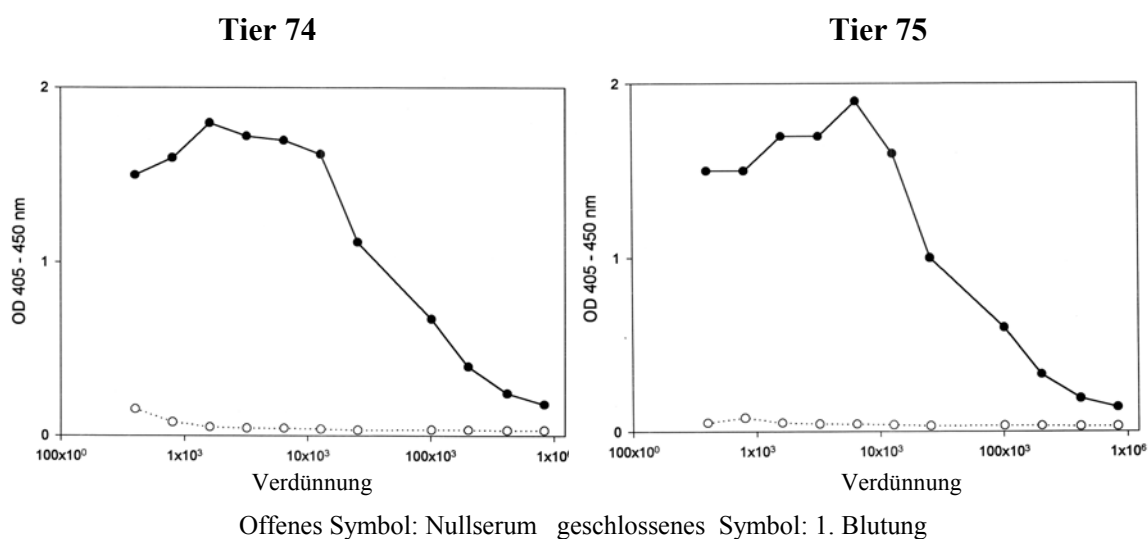


Abb. 7-7 ELISA: Titerbestimmung der Seren 74_I und 75_I gegen das rekombinante pRS1-Protein

Eine Mikrotiterplatte wurde mit dem rekombinanten pRS1-Protein beschichtet und mit einer Verdünnungsreihe der entsprechenden Seren inkubiert. Nach Zugabe von anti-Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase und Para-Nitrophenylphosphat entwickelte sich eine Gelbfärbung, die im ELISA-Reader gemessen werden konnte.

Die Nullseren der Tiere 74 und 75 zeigten im ELISA [Abb. 7-7] nur eine sehr schwache Reaktion. Die Seren der ersten Blutabnahme hingegen reagierten heftig. Beim Serum 74_I konnte bei einer Verdünnung des Serums von 1 : 28.000 und beim Serum 75_I bei Verdünnung von 1 : 25.000 die halbmaximale Extinktion im ELISA nach 20 min gemessen werden.

Nach der Affinitätsreinigung am rekombinanten pRS1 wurde das Serum 75_I im Westernblot getestet. Als Positivkontrolle wurden Schweinenieren-BBMs [Abb. 7-8] eingesetzt.

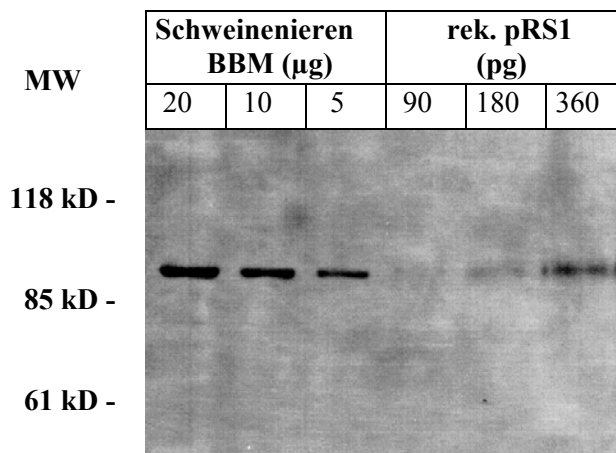


Abb. 7-8 Westernblot: Test des Serums 75_I

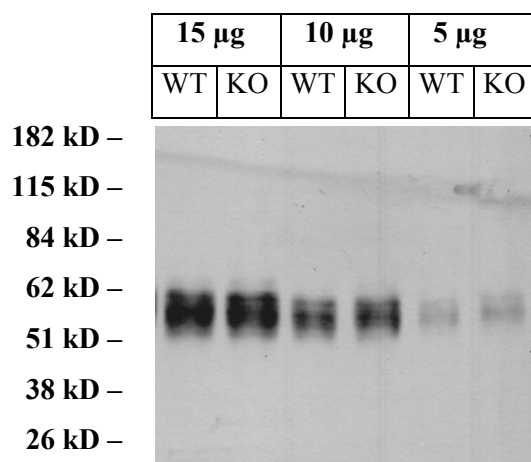
Die Proteine wurden im Laemmli-Puffer denaturiert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde mit affinitätsgereinigtem anti-RS1 Serum 75_I analysiert.

Das affinitätsgereinigte anti-pRS1 Serum 75_I reagierte im Westernblot bei 100 kD [Abb. 7-8] sowohl mit dem pRS1-Protein aus den Nieren-BBMs als auch mit dem rekombinanten pRS1-Protein.

7.8 Die RS1 knock-out Maus

Zur Klärung der physiologischen Bedeutung des RS1 war eine RS1 knock-out Maus geschaffen worden (Baumgarten, 1999). Diese Maus wird zur Zeit von Christina Track untersucht. In Anlehnung an die Ergebnisse der pRS1 anti-sense Strategie in LLC-PK₁ Zellen, die zur Steigerung der SGLT1-Expression führten (Korn, 1999), wurde auch in den RS1 knock-out Mäusen die Expression des SGLT1-Proteins überprüft. Im Westernblot [Abb. 7-9] konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke der SGLT1-Proteine zwischen Wildtyp und RS1 knock-out Maus erkannt werden.

Die breiten SGLT1-Banden bei 60 kD waren im Wildtyp und der RS1 knock-out Maus sowohl beim Auftrag von 15, 10 und 5 µg Nierenmembranen jeweils gleich stark. Im Gegensatz zu den Erwartungen aus den pRS1 anti-sense LLC-PK₁ Zellklonen war bei der RS1 knock-out Maus keine Steigerung der SGLT1-Konzentration in den Nierenmembranen feststellbar.



WT: Wildtyp
KO: RS1 knock-out

Abb. 7-9 Westernblot: Vergleich der SGLT1-Konzentrationen in der Niere der Wildtyp- und RS1 knock-out Maus

Nieren aus jeweils gleichgeschlechtlichen und gleichalten Tieren wurden homogenisiert und mittels differenzieller Zentrifugation wurde eine Fraktion angereicherter Plasmamembranen (40.000 g) gewonnen. Der Westernblot wurde mit affinitätsgereinigtem anti-SGLT1 Serum 187_{VI} analysiert.

7.9 Abkürzungsverzeichnis

AMG	alpha-Methyl-D-Glucopyranosid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BBMV	Bürstensaummembranvesikel
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos PBS
ds	doppelsträngig
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylen-N',N',N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-l-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
ko	knock-out
K _m	Michaelis Menten Konstante
kRS1	Kaninchen RS1
kSGLT1	Kaninchen SGLT1
Lsg.	Lösung
M	Molar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mRS1	Maus RS1
mSGLT1	Maus SGLT1
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase
pRS1	Schwein RS1
pSGLT1	Schwein SGLT1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRS1	Ratten RS1
rSGLT1	Ratten SGLT1
RS1	Regulatory Subunit 1
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase Polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SGLT1	Sodium-Glucose Kotransporter 1
spez.	speziell
sRS1	Schaf RS1
sSGLT1	Schaf SGLT1
SSC	Salines Natriumcitrate
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymidin-5 '-phosphat
UE	Untereinheit
UTP	Uridin-5 '-phosphat
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7.10 Lebenslauf

NAME: Thomas Kühlkamp
GEBURTSDATUM: 24.02.1967
GEBURTSORT: Münster
NATIONALITÄT: deutsch



seit 6.2001

wissenschaftlicher Angestellter der Universität Düsseldorf
bei Prof. Häussinger
SFB 575 Experimentelle Hepatologie

7.1997 bis 10.2000

wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Anatomischen Institut I
der Universität Würzburg bei Prof. Dr. H. Koepsell

10.1991 bis 3.1997

Biologie-Studium an der Universität Münster (Westf.)

Vordiplom: 22.09.93

Diplomarbeit am Mikrobiologischen Institut

bei Prof. Dr. H. Pape

Thema: Stoffwechsel von Maltooligosacchariden in *Actinoplanes*

Diplom: 27.03.1997

8.1988 bis 1.1991

Ausbildung zum Bankkaufmann bei der Stadtsparkasse Münster

Lehrbrief: 21.01.1991

1.07.1987 bis 30.07.1988

Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in Goslar und Delmenhorst

1977–1987

Gymnasium Kinderhaus in Münster

Abitur: 26.05.1987

1973-1977

Grundschule Kinderhaus

Danksagung

Verschiedene Personen haben mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, deren Hilfe ich an dieser Stelle würdigen möchte.

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. H. Koepsell für sein Vertrauen, das Thema und die Möglichkeit, verschiedenste Methoden der modernen biomedizinischen Forschung zu erlernen. Sein hohes Engagement, die intensive Betreuung und die kritischen Durchleutungen waren für mich ein steter Ansporn.

Prof. Dr. U. Scheer hat sich dankenswerter Weise bereit erklärt, die Arbeit zu begutachten. Die Zusammenarbeit mit Dr. Robert Hock ermöglichte mir die Nutzung des konfokalen Laserscan-Mikroskops. Für sein Interesse und die konstruktiven Vorschläge möchte ich Herrn Hock besonderes danken.

Der praktische Einstieg in das Thema wurde mir besonders von Dr. Ulrich Karbach erleichtert, der mir ein aufmerksamer und kritischer Ratgeber war.

Die Zusammenarbeit mit Katharina Baumgarten war besonders erkenntnisreich und bildete einen wichtigen Grundstock für meine weiterführenden Experimente.

Christina Track lernte ich aufgrund ihrer praktischen Kompetenz und Hilfsbereitschaft besonders schätzen.

Zur Klärung molekularbiologischer Fragestellungen war Dr. Valentin Gorboulev für mich eine große Hilfe.

Für die vielen Tipps und Ratschläge nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht bin ich Irina Schatz und Dr. Aida Akhundova besonders dankbar. Herr Michael Christoph danke ich für seine Geduld bei der Lösung vieler Probleme am Computer und seine umgängliche Art.

Mein Laborkollege Marco Elfeber bewies mir mit Humor, dass Spaß an der Arbeit und Erfolg in der Forschung gut zusammenpassen.

Auch wenn ich nur kurz die Gelegenheit hatte, Dr. Andreas Schmidlin kennenzulernen, so war er ein Kollege, den ich mir schon eher gewünscht hätte. Sein unerwarteter Tod hat mich sehr nachdenklich gemacht.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Anderen der Arbeitsgruppe bedanken, die mir alle gute Kollegen waren und so dazu beigetragen haben, dass ich mich gerne an die Zeit am Anatomischen Institut in Würzburg erinnern werde. Vielen Dank!

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiter erkläre ich, dass ich die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe früher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

