

**Intrazelluläres Trafficking des intestinalen
Anionenaustauschers Down-Regulated in Adenoma
(DRA; SLC26A3)**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft

Universität Hohenheim

und

Universitätsklinikum Tübingen

Abteilung für Innere Medizin I

Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionskrankheiten

vorgelegt von

Simone Lissner

aus Tübingen

2011

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Lutz Graeve
2. berichtende Person: Prof. Dr. med. Hans-Georg Lamprecht

Eingereicht am: 30.11.2011
Mündliche Prüfung am: 13.02.2012

Die vorliegende Arbeit wurde am 03.02.2012 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
1.1 RESORPTION UND SEKRETION VON WASSER UND ELEKTROLYTEN IM INTESTINALTRAKT.....	1
1.2 DRA UND NHE3: SCHLÜSSELTRANSPORTPROTEINE DER ELEKTRONEUTRALEN NaCl- RESORPTION IM INTESTINALTRAKT	3
1.2.1 DRA: Anionenaustauscher der SLC26-Genfamilie	3
1.2.2 NHE3: Kationenaustauscher der NHE-Genfamilie.....	5
1.3 REGULATION DER ELEKTRONEUTRALEN NaCl-RESORPTION IM INTESTINALTRAKT	6
1.3.1 PDZ-Adapterproteine: Regulation von intestinalen Transportproteinen	6
1.3.2 PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie	7
1.3.3 Regulation von NHE3 durch PDZ-Adapterproteine.....	9
1.3.4 Regulation von DRA durch PDZ-Adapterproteine	10
1.4 DETERGENZIEN-RESISTENTE MEMBRANDOMÄNE: BEDEUTUNG FÜR TRANSPORTPROTEINE	11
1.5 RABGTPASEN: KOORDINATOREN DES INTRAZELLULÄREN VESIKELTRANSPORTS	15
1.6 PI3-KINASE: IHR EINFLUSS AUF DAS INTRAZELLULÄRE TRAFFICKING VON TRANSPORTPROTEINEN	18
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
2 Material und Methoden	21
2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	21
2.1.1 Ausgangsplasmide.....	21
2.1.2 Bakterienstämme	21
2.1.3 Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	22
2.1.4 Herstellung von kompetenten Bakterien.....	22

2.1.5	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> Bakterien.....	23
2.1.6	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	23
2.1.7	Restriktionsenzym-Verdau von DNA.....	23
2.1.8	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.1.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	24
2.1.10	Ligation von Vektor und Insert.....	25
2.1.11	In dieser Arbeit erzeugte Konstrukte.....	25
2.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	29
2.2.1	Zellkultur.....	29
2.2.2	Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid.....	31
2.2.3	Störung der Raft-Integrität durch Methyl- β -Cyclodextrin.....	32
2.2.4	Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002.....	32
2.2.5	Fluorometrie.....	32
2.2.6	Präparation von <i>detergent-resistant membranes</i>	34
2.2.7	Oberflächenbiotinylierung.....	36
2.2.8	Isolation von Rab-haltigen Vesikeln.....	37
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	39
2.3	PROTEINANALYTISCHE METHODEN.....	40
2.3.1	Proteinisolierung.....	40
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	41
2.3.3	SDS-PAGE.....	41
2.3.4	Western Blotting.....	43
2.3.5	Immundetektion.....	43
3	Ergebnisse.....	47
3.1	LIPID RAFTS: IHR EINFLUSS AUF DEN DURCH DRA VERMITTELTEN Cl^-/HCO_3^- - AUSTAUSCH DRA.....	47
3.1.1	Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf den durch DRA vermittelten Cl^-/HCO_3^- - Austausch in HEK-Zellen.....	47
3.1.2	Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf den durch DRA vermittelten Cl^-/HCO_3^- - Austausch in Caco-2/BBE-Zellen.....	50
3.1.3	Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf die Oberflächenexpression von DRA in HEK-Zellen.....	52
3.2	PI3-KINASE: IHR EINFLUSS AUF DEN DURCH DRA VERMITTELTEN Cl^-/HCO_3^- - AUSTAUSCH.....	53

3.2.1	Inhibition der PI3-Kinase: Einfluss auf den durch DRA vermittelten Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austausch in HEK-Zellen	54
3.2.2	Inhibition der PI3-Kinase: Einfluss auf die Oberflächenexpression von DRA in HEK-Zellen	56
3.3	LIPID RAFTS UND PI3-KINASE: BEEINFLUSSUNG DES GLEICHEN TRAFFICKING-PFADES VON DRA	58
3.3.1	Gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf den durch DRA vermittelten Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austausch in HEK-Zellen	58
3.3.2	Inhibition der PI3-Kinase: Einfluss auf die Raft-Assoziation von DRA in HEK-Zellen	60
3.3.3	Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf die Aktivität der PI3-Kinase in HEK-Zellen	62
3.4	DAS PDZ-INTERAKTIONSMOTIV: EINFLUSS AUF DIE OBERFLÄCHENEXPRESSION UND DEGRADATION VON DRA	63
3.5	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON DRA	66
3.5.1	Isolation von Rab5-, Rab7- und Rab11-haltigen Vesikeln mittels Sucrose-Gradienten-Zentrifugation und Immunisolierung.....	66
3.5.2	DRA und DRA-ETKFminus sind in unterschiedlichen Endosomen-Populationen lokalisiert.....	78
3.6	RAB11A: EINFLUSS AUF DIE TRANSPORTAKTIVITÄT UND OBERFLÄCHENEXPRESSION VON DRA	81
4	Diskussion	85
4.1	DIE INSERTION VON DRA IN DIE PLASMA-MEMBRAN: EINFLUSS VON LIPID RAFTS, DER PI3-KINASE UND PDZ-ADAPTERPROTEINEN	85
4.2	LOKALISATION VON DRA IN UNTERSCHIEDLICHEN ENDOSOMEN-POPULATIONEN	91
4.3	MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER IMMUNISOLATION	96
5	Zusammenfassung.....	97
6	Summary.....	99
7	Literaturverzeichnis	101
8	Anhang.....	116
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	116

8.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	118
8.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
8.4	ERKLÄRUNG.....	123
8.5	DANKSAGUNG	124
8.6	LEBENS LAUF	125
8.7	PUBLIKATIONEN.....	126

1 EINLEITUNG

1.1 Resorption und Sekretion von Wasser und Elektrolyten im Intestinaltrakt

Neben der Verdauung und Aufnahme von zugeführter Nahrung ist der Darm auch verantwortlich für die Sekretion und Absorption von Elektrolyten und Wasser. Durchschnittlich passieren täglich ca. 9 Liter Flüssigkeit den Darm. Davon stammen nur 2 Liter aus Nahrung und Getränken, die restlichen 7 Liter aus endogenen Sekreten¹. Ein Großteil der Flüssigkeit wird im Dünndarm resorbiert, ca. 60% im Duodenum und Jejunum und 30% im Ileum. Der Rest, ca. 10%, wird im Kolon aufgenommen, so dass nur ca. 1% mit dem Stuhl ausgeschieden wird. Die Wasserresorption wird vor allem durch die Absorption von Natriumchlorid (NaCl) und organischen Stoffen angetrieben. Die luminalen Na⁺- und Cl⁻-Konzentrationen sinken vom Duodenum bis zum Kolon stetig ab. Die Konzentration von Na⁺ beträgt anfangs 145 mmol/l, im Ileum nur noch 125 mmol/l und im Kolon ist sie auf 40 mmol/l abgesunken. Im Darm gibt es vier Arten der Na⁺- und Cl⁻-Bewegung: (A) nährstoffgekoppelte Na⁺-Absorption, (B) elektroneutrale NaCl-Resorption, (C) elektrogene Cl⁻-Sekretion und (D) elektrogene Na⁺-Absorption. All diese Transportprozesse benötigen einen elektrochemischen Gradienten, der durch Transportproteine auf der basolateralen Seite aufrechterhalten wird (Na⁺/K⁺-ATPase, Cl⁻-Kanal, K⁺-Kanal) (Kato and Romero, 2011).

(A) Nährstoffgekoppelte Na⁺-Absorption: Diese nährstoffgekoppelte Na⁺-Absorption erfolgt durch Na⁺/Glucose-Cotransporter (SGLTs) (Wright et al., 1992; Wright and Turk, 2004) und einige Na⁺/Aminosäuren-Cotransporter (Slc6, Slc38 etc.) (Boll et al., 2004; Verrey et al., 2009). Diese transepitheliale Na⁺-Aufnahme erzeugt ein lumen negatives transepitheliales Potenzial, welches eine parazelluläre Aufnahme von Cl⁻ und Wasser zur Folge hat.

(B) Elektroneutrale NaCl-Resorption: Zwischen 1960 und 1980 wurde gezeigt, dass der Dünndarm und das proximale Kolon eine basale NaCl- und Wasser-Resorption aufweisen

¹ 1500 ml Speichelflüssigkeit, 2500 ml Magensaft, 500 ml Galle, 1500 ml Pankreassaft und 1000 ml vom Darm selbst sezernierte Flüssigkeit

ohne Beteiligung von Nährstoffen (Glucose oder Aminosäuren) und ohne Veränderung des transepithelialen Potenzials. Auf Grund dessen wurde diese Art der Absorption elektroneutrale NaCl-Resorption genannt. Diese NaCl- und Wasser-Absorption erfolgt durch funktionell gekoppelte Na^+/H^+ -Austauscher und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (siehe Kapitel 1.2).

(C) Elektrogene Cl^- -Sekretion: Eine Stimulation der Darmmukosa, auf die eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-, Ca^{2+} - oder cGMP-Spiegel folgt, führt zu einer Hemmung der elektroneutralen NaCl-Resorption und zu einer Stimulation der Cl^- -Sekretion. Diese Cl^- -Sekretion erfolgt durch CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, Cl^- -Kanal) (Riordan et al., 1989). Das Verschieben von Cl^- aus den Epithelzellen in das Darmlumen führt zu einem lumennegativen transepithelialen Potenzial, welches eine parazelluläre Sekretion von Na^+ und Wasser zur Folge hat. Diese CFTR-vermittelte elektrogene Cl^- -Sekretion erfolgt im gesamten Dünndarm und Dickdarm.

(D) Elektrogene Na^+ -Absorption: Diese Art der Na^+ -Absorption erfolgt ausschließlich im distalen Kolon. Die luminalen Na^+ -Konzentration nimmt im Kolon von proximal nach distal ab. Das resultierende lumennegative transepitheliale Potenzial fördert die Absorption von Na^+ gegen den bestehenden Na^+ -Gradienten. Diese Na^+ -Aufnahme erfolgt durch den Na^+ -Kanal ENaC (epithelial Na^+ channel) (Canessa et al., 1994).

Im Einzelnen läuft die NaCl-Resorption folgendermaßen ab: In Duodenum und Jejunum erfolgt ein passiver Na^+ -Einstrom in die Zelle, der dazu dient, Glucose, Aminosäuren, Phosphat und weitere Nährstoffe sekundäraktiv in die Zelle aufzunehmen. Dieser Transport geschieht elektrogen, so dass ein lumennegatives transepitheliales Potenzial entsteht, welches Cl^- parazellulär aus dem Lumen treibt. Im Ileum erfolgt eine elektroneutrale NaCl-Resorption durch parallelen Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch. Luminale Na^+ wird im Austausch gegen H^+ -Ionen aufgenommen und parallel dazu Cl^- im Austausch gegen HCO_3^- . Die H^+ -Ionen und HCO_3^- reagieren luminal zu Wasser und CO_2 . Im rechtsseitigen Kolon erfolgt die NaCl-Resorption weiterhin durch parallelen Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch. Zusätzlich wird im linksseitigen Kolon Na^+ durch luminale Natriumkanäle (ENaC) absorbiert, wodurch ein lumennegatives transepitheliales Potenzial entsteht, welches Cl^- wiederum aus dem Lumen treibt.

Der intestinale Elektrolyttransport wird neuronal, hormonell, durch Bakterientoxine oder durch Laxantien beeinflusst. Wird im Gastrointestinaltrakt zu viel Flüssigkeit sezerniert oder ist die Flüssigkeitsaufnahme im Darm, aufgrund einer entgleisten Elektrolyt- und Wasser-Resorption gestört, werden über den Stuhl zu große Flüssigkeitsmengen ausgeschieden. Folglich kommt es zu Diarrhöe. Um eine gestörte Elektrolyt- und Wasser-Resorption

aufzuklären, müssen die physiologische Regulation von Transportproteinen sowie die extra- und intrazellulären Signaltransduktionswege aufgeklärt werden.

1.2 DRA und NHE3: Schlüsseltransportproteine der elektroneutralen NaCl-Resorption im Intestinaltrakt

Bereits 1985 wurde die funktionelle Kopplung des Natrium- und Chloridtransports an der Bürstensaummembran des Kaninchenileums untersucht (Knickelbein et al., 1983; Knickelbein et al., 1985), ohne dass die molekulare Identität der Ionenaustauscher bekannt war. Es zeigte sich, dass es sich weder um einen direkten Na^+/Cl^- -Cotransport noch um einen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransport handelt, sondern dass für die elektroneutrale NaCl-Resorption im Ileum ein Na^+/H^+ - und ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher verantwortlich sind.

Für den Na^+/H^+ -Austauscher kommen die aus der SLC9-Genfamilie stammenden Isoformen NHE1-3 (Na^+/H^+ -Austauscher) in Betracht. Es werden aber nur zwei dieser Isoformen, NHE2 und NHE3, in den apikalen Membranen der Epithelzellen des Dünndarms und Kolons exprimiert, womit NHE1 als verantwortlicher Na^+/H^+ -Austauscher ausgeschlossen werden kann. Experimentelle Versuche mit NHE3- und NHE2-Knockout-Mäusen zeigten, dass nur NHE3-Knockout-Mäuse an Diarrhöe erkranken (Schultheis et al., 1998). Dies ließ darauf schließen, dass NHE3 eine Hauptrolle bei der elektroneutralen NaCl-Resorption im Ileum und Kolon spielt.

Die am $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch beteiligten Transporter werden durch zwei Genfamilien kodiert, die Anionenaustauscher AE1, AE2 und AE3 aus der SLC4-Familie und zehn Anionenaustauscher der SLC26-Genfamilie. Aus der SLC4-Familie kommt nur der AE2 für den Austausch in Frage, da nur dieser im Intestinaltrakt exprimiert wird. Jedoch wurde gezeigt, dass dieser basolateral lokalisiert ist (Alper et al., 1999). Der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der zusammen mit NHE3 im Ileum und Kolon für die NaCl-Resorption verantwortlich ist, muss somit aus der SLC26-Genfamilie stammen.

1.2.1 DRA: Anionenaustauscher der SLC26-Genfamilie

1993 wurde ein Gen aus der Mukosa des menschlichen Kolons von Schweinfest et al identifiziert, dessen Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in Kolonadenomen und Adenokarzinomen herunterreguliert ist. Sie nannten es deshalb DRA (down-regulated in adenoma) (Schweinfest et al., 1993). Schon 1945 wurde ein Krankheitsbild von zwei Patienten beschrieben, die an wässriger Diarrhöe mit hohem Chloridgehalt im Stuhl und

metabolischer Alkalose litten. Die Erkrankung wurde daraufhin als Metabolische Alkalose mit Diarrhöe bezeichnet. Später erfolgte die Umbenennung der Erkrankung in Kongenitale Chlorid Diarrhöe (CLD = chloride losing diarrhea). Perfusionsstudien deckten auf, dass die CLD auf einen Defekt des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches im Ileum und Kolon zurückzuführen ist (Holmberg et al., 1975). 1996 wurde die Lokalisation des CLD auslösenden Gens entdeckt. Das Gen liegt an derselben Position wie das von Schweinfest beschriebene DRA-Gen (Hoglund et al., 1996a). Es konnte daraufhin eine Verbindung zwischen DRA und CLD hergestellt werden, indem gezeigt wurde, dass eine Mutation im DRA-Gen die Kongenitale Chlorid Diarrhöe hervorruft (Hoglund et al., 1996b; Hoglund et al., 1998). Diese Erkrankung sowie Knockout-Mäuse (Walker et al., 2008), die an chronischer Diarrhöe leiden, heben die Bedeutung von DRA für eine gesunde Elektrolyt- und Wasser-Resorption hervor.

DRA ist ein Anionenaustauscher der SLC26-Genfamilie. SLC26-Proteine transportieren monovalente (Cl^- , Iodide, Formate, OH^- und HCO_3^-) sowie divalente Anionen (SO_4^{2-} und Oxalate). Computerunterstützten Vorhersagen zufolge ist DRA ein aus 10, 12 oder 14 Transmembrandomänen bestehendes Transmembranprotein mit einem kurzen intrazellulär gelegenen N-Terminus und einem langen intrazellulär gelegenen C-Terminus. Am N-terminalen Ende ist DRA mehrfach glykosyliert (Byeon et al., 1996). Die vier C-terminalen Aminosäuren von DRA sind Glutamat, Threonin, Lysin und Phenylalanin (ETKF). Dieses Sequenzmotiv ähnelt einem Typ-I-PDZ-Interaktionsmotiv (Hung and Sheng, 2002). DRA wird in der apikalen Membran von den an der Oberfläche gelegenen Enterozyten des Duodenums (Jacob et al., 2002), des Ileums (Byeon et al., 1996) und des proximalen Kolons (Byeon et al., 1996) exprimiert. Auch in Samenbläschen, in Schweißdrüsen (Haila et al., 2000) sowie in Gewebekulturen des Pankreasgangs und der Trachea (Wheat et al., 2000) wird DRA exprimiert. An Oozyten des Krallenfrosches wurde nachgewiesen, dass es sich bei DRA um einen darmspezifischen 4,4'-Diisothiozinstilben-2',2'-Disulfonsäure-(DIDS)-sensitiven Sulfat- und Oxalat-Transporter handelt (Silberg et al., 1995). Weiter konnte gezeigt werden, dass DRA zusätzlich zum Sulfattransport auch einen DIDS-sensitiven Chloridtransport vermittelt, wobei die Anwesenheit von Chlorid den Sulfattransport hemmt. Des Weiteren arbeitet DRA natriumabhängig und vermittelt den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch, welcher mit dem NHE3 vermittelten Na^+/H^+ -Austausch für die intestinale NaCl-Resorption verantwortlich ist (Melvin et al., 1999).

Neben DRA ist auch PAT1 (putative anion transporter 1) im Intestinaltrakt lokalisiert. Bei PAT1 handelt es sich auch um einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher der SLC26-Genfamilie (SLC26A6). PAT1 wird im Darm, in der Niere, im Pankreas, im Herzen und in der Placenta exprimiert (Aronson, 2006; Soleimani, 2006; Wang et al., 2002). Im Darm findet sich PAT1

vor allem im Duodenum, Jejunum und im Ileum. Studien an DRA-Knockout-Mäusen und PAT1-Knockout-Mäusen zeigten, dass beide Transporter entscheidend sind für die Cl^- -Aufnahme und HCO_3^- Sekretion im Intestinaltrakt (Gawenis et al., 2004; Seidler et al., 2008; Walker et al., 2008). DRA und PAT1 spielen eine Rolle bei der unstimulierten HCO_3^- -Sekretion im Duodenum, wobei hier PAT1 wichtiger erscheint. Gleichzeitig scheint DRA wichtiger zu sein für die cAMP-stimulierte duodenale HCO_3^- -Sekretion. Im Jejunum sind beide Transportproteine wichtig für die Cl^- -Absorption, wobei DRA hier reichlicher vorkommt (Kato and Romero, 2011). Im Kolon spielt nur noch DRA eine entscheidende Rolle für die dortige Cl^- -Absorption (Schweinfest et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es sich bei DRA um einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher der SLC26-Genfamilie handelt, und zwar um den Cl^- -Transporter SLC26A3. Zusammen mit dem Na^+/H^+ -Austauscher NHE3 ist er für die elektroneutrale NaCl-Resorption im Ileum und Kolon verantwortlich.

1.2.2 NHE3: Kationenaustauscher der NHE-Genfamilie

Die elektroneutrale NaCl-Resorption im Intestinaltrakt wird neben DRA und PAT1 durch Transportproteine der NHE-Familie (Na^+/H^+ -Austauscher) vermittelt (Field, 2003). Die NHE-Genfamilie beinhaltet neun verschiedene Isoformen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind (NHE1-5 und -8) oder in intrazellulären Kompartimenten vorkommen (NHE6-7 und -9) (Brett et al., 2005; Orłowski and Grinstein, 1997; Orłowski and Grinstein, 2004; Wakabayashi et al., 1997). Alle Isoformen der NHE-Familie besitzen eine N-terminale Domäne mit 10-12 Transmembrandomänen und eine lange zytoplasmatische C-terminalen Domäne. Der zuerst entdeckte Na^+/H^+ -Austauscher im Intestinaltrakt, NHE1, wird in der basolateralen Membran exprimiert (Orłowski and Grinstein, 1997). NHE2 und NHE3 werden in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen des Dünndarms und Kolons exprimiert (Hoogerwerf et al., 1996). Für eine normale Gastrointestinalphysiologie spielt jedoch nur NHE3 eine Rolle (Bachmann et al., 2004; Seidler et al., 2009).

1.3 Regulation der elektroneutralen NaCl-Resorption im Intestinaltrakt

1.3.1 PDZ-Adapterproteine: Regulation von intestinalen Transportproteinen

PDZ-Adapterproteine bilden eine große Klasse intrazellulärer Proteine. Sie können in den verschiedensten Kompartimenten der Zelle gefunden werden und sind häufig Schlüsselproteine für die Bildung von Proteinkomplexen. Der Name PDZ stammt von den ersten drei identifizierten Proteinen dieser Art. Diese waren: PSD95², DLG³ und ZO-1⁴. PDZ-Adapterproteine enthalten sogenannte PDZ-Domänen. Über diese Domänen kann eine Interaktion mit anderen Proteinen erfolgen. Die PDZ-Domäne ist 90-100 Aminosäuren lang, kompakt und kugelförmig gefaltet, bestehend aus sechs β -Strängen (β A- β F) und zwei α -Helices (α A- α B) (Harris and Lim, 2001). Die Ligandenbindung erfolgt zwischen dem zweiten β -Strang und der zweiten α -Helix. Der Ligand fungiert als ein weiterer „ β -Strang“, der sich an den zweiten β -Strang der PDZ-Domäne anlagert. Zwischen den beiden β -Strängen kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken (Harris and Lim, 2001). Die Ligandenbindung wird daher als *beta strand addition* bezeichnet. PDZ-Domänen erkennen C-terminale Sequenzmotive ihrer Liganden, die in der Regel vier Aminosäuren lang sind. Die vier C-terminalen Aminosäuren von DRA sind Glutamat, Threonin, Lysin und Phenylalanin (ETKF). Dieses Sequenzmotiv ähnelt einem Typ-I-PDZ-Interaktionsmotiv. Einige PDZ-Domänen interagieren auch mit intern gelegenen PDZ-Interaktionsmotiven. NHERF-1 (EBP50) interagiert zum Beispiel mit dem internen PDZ-Interaktionsmotiv von NHE3 (Kurashima et al., 1999). Die Unterteilung der PDZ-Domänen erfolgt in drei Klassen, basierend auf der Aminosäure auf Position 0 (die letzte Aminosäure des C-terminalen Sequenzmotivs) sowie der Aminosäure auf Position 2 des Liganden: Klasse I (S/T-X- Φ), Klasse II (Φ -X- Φ) und Klasse III (Ψ -X-C), wobei X für eine beliebige, Φ für eine hydrophobe und Ψ für eine negativ geladene Aminosäure steht (Hung and Sheng, 2002). Die Bindungspartner der PDZ-Adapterproteine sind unterschiedlicher Herkunft. Es kann sich um Wachstumsfaktor-Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Neurotransmitter-Rezeptoren, Transportproteine, Adhesionsmoleküle, Elemente des Zytoskeletts und Transkriptionsfaktoren handeln (Harris and Lim, 2001; Hung and Sheng, 2002; Nourry et al., 2003).

² Post synaptic density

³ *Drosophila melanogaster* discs large protein

⁴ Zonula occludens 1 protein

1.3.2 PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie

Die NHE3 regulatory factor (NHERF)-Familie besteht aus vier PDZ-Adapterproteinen: NHERF1, NHERF2, NHERF3 und NHERF4. Diese PDZ-Proteine werden in diversen Organen des Körpers exprimiert – im Dünndarm, im Kolon, im proximalen Tubulus der Niere und zum Teil in der Leber. Eine wichtige Funktion dieser Proteine ist die Regulation der Elektrolyt- und Wasser-Resorption im Intestinaltrakt (Lamprecht and Seidler, 2006). Eine Übersicht über die Mitglieder der NHERF-Familie gibt Abbildung 1.1.

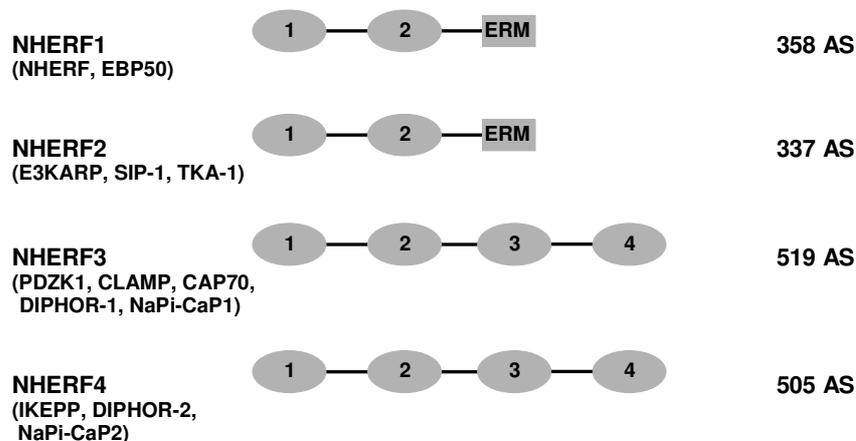


Abbildung 1.1: Überblick über die Mitglieder der NHERF-Familie

Angegeben sind die PDZ-Domänen (1, 2, 3, 4), die Anzahl an Aminosäuren sowie die ERM-Domäne (Ezrin-Radixin-Moesin-Bindungsdomäne). Modifiziert nach Donowitz und Li, 2007.

NHERF1 (auch genannt NHERF, EBP50) und NHERF2 (auch genannt E3KARP, SIP-1, TKA1) weisen eine hohe Homologie auf (ca. 52% Sequenzübereinstimmung der humanen Orthologe). Beide Proteine besitzen jeweils zwei PDZ-Domänen sowie eine ERM-(Ezrin-Radixin-Moesin)-Domäne. Über diese ERM-Domäne binden sie über Ezrin an Aktin des Zytoskeletts (Sun et al., 2000). Einige Proteine binden ausschließlich an NHERF1 oder NHERF2, andere Liganden können auch an beide PDZ-Proteine binden, z.B. CFTR, NHE3 oder DRA (Lamprecht and Seidler, 2006). NHERF1 ist im Gegensatz zu NHERF2 ein Phosphorprotein (Hall et al., 1999), welches durch GRK6A (G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinase 6A), PKA (Proteinkinase A), PKC (Proteinkinase C) sowie cdc2 (Cyclin dependent kinase 2) phosphoryliert werden kann (Deliot et al., 2005; Lau and Hall, 2001). Die Dephosphorylierung von NHERF1 kann durch die Phosphatase 1 (PP1) bzw. PP2A erfolgen (He et al., 2001). Phosphoryliertes NHERF1 zeigt eine erhöhte Bindungsaffinität zu CFTR. Das Parathormon (PTH) stimuliert die Phosphorylierung von Ser-77 der PDZ-Domäne I von NHERF1 durch PKA oder PKC. Diese Phosphorylierung führt zu einer

Auflösung des NHERF1/Npt2a-(Natrium/Phosphat-Cotransporter)-Komplexes. NHERF1-Knockout-Mäuse (Ser77 wurde durch ein Ala ersetzt) zeigen einen erhöhten Phosphat-Transport vermittelt durch Npt2a. Das heißt, eine Hemmung des Phosphat-Transportes durch Npt2a erfolgt über die Phosphorylierung von NHERF1 und die daraus resultierende Dissoziation des NHERF1/Npt2a-Komplexes (Weinman et al., 2007). NHERF1 und NHERF2 können Homo- und Heteromultimere über die PDZ-Domänen bilden (Lamprecht and Seidler, 2006; Lau and Hall, 2001). Interessanterweise zeigt eine NHERF1/NHERF1-Assoziation eine sehr geringe Affinität und eine NHERF2/NHERF2-Assoziation eine relativ starke Affinität. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass NHERF1 Heterodimere bilden kann mit NHERF2 oder NHERF3. Es wird angenommen, dass NHERF1 und NHERF3 Netzwerke aus Membranproteinen und regulatorischen Komponenten in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen des Darms bilden und dadurch die Stabilität von Membranproteinen in der Plasmamembran positiv beeinflussen (Lau and Hall, 2001).

NHERF3 wurde entdeckt als ein Protein, das im proximalen Tubulus der Niere und im Dünndarm der Ratte hochreguliert wird, wenn diese mit einer phosphatarmer Diät gefüttert wird. Es ergab sich daher der Name diphor-1 (dietary Pi-regulated RNA-1) (Custer et al., 1997). Weitere Namen von NHERF3 sind: PDZK1, CLAMP, CAP70 und NaPi-Cap1. NHERF3 weist außer vier PDZ-Domänen keine weiteren funktionellen Domänen auf, kann aber am Ser-509 phosphoryliert werden durch PKA (Nakamura et al., 2005). NHERF3 wird nahe der apikalen Membran von Epithelzellen der Niere, des Pankreas, der Leber und des Intestinaltrakts exprimiert (Lamprecht and Seidler, 2006). CFTR, NHE3, PAT1 und DRA können an NHERF3 binden (Lamprecht and Seidler, 2006). Koch et al. entwickelten einen NHERF3-Knockout-Mäusestamm, um die Funktion von NHERF3 innerhalb von Multiproteinkomplexen und dessen Einfluss auf die Elektrolyt- und Wasser-Resorption näher zu untersuchen. Diese Mäuse zeigen keine offensichtlichen Krankheitssymptome. Sie weisen eine normale Darmmukosa sowie eine normale Elektrolytkonzentration im Blut auf (Kocher et al., 2003a). Einzig der Lipoproteinstoffwechsel der Leber ist gestört (Kocher et al., 2003b). NHERF3 weist zu NHERF4 (IKEPP) eine Homologie auf, ihre vier PDZ-Domänen sind zu ca. 30-50% identisch (Scott et al., 2002).

Bei NHERF4 handelt es sich um das zuletzt entdeckte Mitglied der NHERF-Familie. Weitere Namen sind: diphor-2 und NaPi-CaP2. NHERF4 wird in hohen Mengen in der Niere und im Gastrointestinaltrakt exprimiert, daher auch der Name IKEPP (intestinal and kidney enriched PDZ domain protein). Es ist nicht oder nur in geringen Mengen in der Bürstensaummembran lokalisiert. NHERF4 erhöht die Transportaktivität des organischen Kationen/Carnitin-Transporters OCTN2 durch Modulation der Zelloberflächenexpression (Watanabe et al., 2006). Des Weiteren interagieren die epithelialen Ca^{2+} -Kanäle TRPV5

und TRPV6 mit NHERF4 (van de Graaf et al., 2006), und NHERF4 spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Aktivität der Guanylylcyclase C (GCC) (Scott et al., 2002; Thelin et al., 2005). Die NHERF4-GCC-Interaktion inhibiert die durch Enterotoxin vermittelte Aktivierung der GCC und somit die cGMP-Bildung, die eine Öffnung des CFTR-Kanals zur Folge hat (Giannella and Mann, 2003).

Die NHERFs haben sowohl einzelne als auch überschneidende zelluläre Funktionen. Bis jetzt konnten über 30 verschiedene Bindungspartner identifiziert werden, von denen viele mit mehreren Mitgliedern der NHERF-Familie interagieren. Zum Beispiel interagiert NHERF1, NHERF3 und NHERF4 mit dem Natrium-Phosphat-Transporter Typ IIa oder NHERF2, NHERF1, NHERF3 und NHERF4 mit NHE3. Das Vorhandensein von mehreren Bindungspartnern suggeriert eine funktionelle Redundanz – einen Überfluss an PDZ-Adapterproteinen. Jedoch sichert jedes der PDZ-Adapterproteine eine besondere zelluläre Funktion. NHERF1 und NHERF2 können cAMP abhängig zur Inhibition von NHE3 führen, PKC abhängig ist hingegen nur NHERF2. Sowohl die unterschiedliche subzelluläre Verteilung der einzelnen PDZ-Adapterproteine sowie die der Bindungspartner als auch die verschiedene Expression in den einzelnen Geweben kann zur Bildung einzigartiger Multiproteinkomplexe führen.

1.3.3 Regulation von NHE3 durch PDZ-Adapterproteine

Wenn die intestinale Mucosa durch Enterotoxine oder Neurotransmitter stimuliert wird, steigt die intrazelluläre cAMP-, Ca^{2+} - oder cGMP-Konzentration an. Dies führt zu einer Inhibition der elektroneutralen NaCl-Resorption und zu einer Stimulation der Cl^- -Sekretion (Kato and Romero, 2011). NHE3 ist neben CFTR Hauptziel dieser second Messenger. Für die Inhibition von NHE3 sind neben diesen second Messenger jedoch auch die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie von Bedeutung (Lamprecht and Seidler, 2006). Diese NHERFs vermitteln die Interaktion von NHE3 mit anderen Membranproteinen, dem Zytoskelett, Proteinkinasen und weiteren Regulatorproteinen. Die cAMP vermittelte Inhibition von NHE3 benötigt NHERF1, NHERF2 (Yun et al., 1997) sowie NHERF3 (Cinar et al., 2007). Die Ca^{2+} vermittelte Inhibition von NHE3 benötigt hingegen nur NHERF2 (Kim et al., 2002; Lee-Kwon et al., 2003) und NHERF3 (Cinar et al., 2007), nicht NHERF1. Die Inhibition von NHE3 durch cGMP erfolgt hingegen über NHERF2 (Cha et al., 2005). cAMP aktiviert die PKA, die über das Zytoskelettprotein Ezrin an NHERF1/2 bindet und schließlich Serinreste von NHE3 phosphoryliert (Lamprecht et al., 1998; Yun et al., 1997). In PS120/NHE3-Zellen, die nicht NHERF1 und NHERF2 exprimieren, kann keine cAMP vermittelte NHE3-Inhibition beobachtet werden. Durch Transfektion eines der beiden PDZ-Adapterproteine kann die cAMP vermittelte NHE3-Inhibition wieder hergestellt werden

(Weinman et al., 2000). cGMP aktiviert die cGMP abhängige Proteinkinase II (cGKII), welche mit NHERF2 interagiert und eine Phosphorylierung von NHE3 auslöst (Cha et al., 2005). Ca^{2+} induziert die Membran-Assoziation der PKC α , die mit NHERF2 und α Actinin 4 interagiert und NHE3 phosphoryliert (Kim et al., 2002). Der so gebildete Komplex könnte die Endozytose von NHE3 induzieren. Ein weiterer Mechanismus, bei dem ein NHERF-Protein eine Rolle spielt, ist die Stimulation von NHE3 durch Lysophosphatidylsäure (LPA). In NHERF2-exprimierenden OK-Zellen führt eine Stimulation der Zellen mit LPA zu einer erhöhten Oberflächenexpression von NHE3. Wahrscheinlich wird NHERF2 benötigt für die LPA-induzierte Stimulation der Phospholipase C (PLC) (Choi et al., 2004; Murtazina et al., 2011). Dies resultiert in einer PLC abhängigen Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} und führt zu einer verstärkten Exozytose von NHE3. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LPA über den LPA5- sowie über den EGF-Rezeptor NHE3 beeinflusst (Yoo et al., 2011).

1.3.4 Regulation von DRA durch PDZ-Adapterproteine

Studien an isolierter intestinaler Mukosa zeigten, dass nach Stimulation mit Enterotoxinen oder Neurotransmitter und der daraus resultierenden erhöhten intrazellulären cAMP-, cGMP- und Ca^{2+} -Konzentration der Cl^- -Influx reduziert und der Cl^- -Efflux stimuliert ist. Die gebildeten second Messenger hemmen somit die durch DRA bzw. PAT1 vermittelte Cl^- -Absorption. Jedoch sind die inhibitorischen Mechanismen bezüglich DRA und PAT1 im Vergleich zu NHE3 wenig verstanden. Das PDZ-Interaktionsmotiv von DRA interagiert mit der zweiten PDZ-Domäne von NHERF2 (Lamprecht et al., 2002) sowie der zweiten und dritten PDZ-Domäne von NHERF3 (Rossmann et al., 2005), des Weiteren interagiert DRA auch mit NHERF1 und NHERF4 (Lamprecht and Seidler, 2006). Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt zu einer Verminderung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches vermittelt durch DRA in Abhängigkeit von NHERF3. In HEK-Zellen, die kein NHERF3 exprimieren, kann keine Ca^{2+} vermittelte DRA-Inhibition beobachtet werden. Durch Transfektion von NHERF3 kann die Ca^{2+} vermittelte DRA-Inhibition wieder hergestellt werden (Lamprecht et al., 2009). Jedoch wird DRA nicht inhibiert nach einer Inkubation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, Aktivator der PKC); somit vermittelt die PKC keine Inhibition des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches (Lamprecht et al., 2009). Des Weiteren hat ein erhöhter cAMP-Spiegel eine Internalisierung von DRA zur Folge (Musch et al., 2009). Ähnlich zu NHE3 wird DRA auch durch LPA stimuliert. Im Gegensatz zu NHE3 ist jedoch weder die beteiligte Signalkaskade aufgeklärt noch die Frage, ob PDZ-Adapterproteine beteiligt sind. LPA soll wie *Lactobacillus acidophilus* die Plasmamembranexpression von DRA erhöhen, wahrscheinlich über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg (Raheja et al., 2010; Singla et al., 2010). Im proximalen Bereich des Dünndarms könnte eine Verknüpfung von DRA und CFTR über ein PDZ-Adapterprotein für die basale HCO_3^- - und Cl^- -Sekretion von Bedeutung

sein bzw. zu deren Stimulation führen. Im Pankreas und in cotransfizierten HEK-Zellen können DRA und CFTR copräzipitiert werden (Ko et al., 2002). Die Coexpression von CFTR und DRA führt zu einer Aktivitätssteigerung von CFTR. Die Transportaktivität von DRA wird stimuliert durch die cAMP abhängige Aktivität von CFTR (Ko et al., 2002; Lee et al., 1999a; Lee et al., 1999b). Die strukturelle Kopplung dieser beiden Transporter, so glaubt man, ist der grundlegende Mechanismus der gegenseitigen Aktivitätsbeeinflussung dieser Transporter. CFTR bindet über seine regulatorische Domäne nach Phosphorylierung durch PKA an die STAS-Domäne von DRA (Ko et al., 2004).

1.4 Detergenzien-resistente Membrandomäne: Bedeutung für Transportproteine

Biologische Membranen sind nach einem einheitlichen Muster aufgebaut. Sie bestehen aus einer etwa 6 nm dicken kontinuierlichen Doppelschicht aus amphipathischen Lipiden, in die Proteine eingebettet sind. Zusätzlich können Kohlenhydrate (Mono-, Oligosaccharide) an die Lipide bzw. Proteine gebunden sein. Der Lipid-, Protein- und Kohlenhydratanteil ist je nach Zell- und Membrantyp sehr unterschiedlich. Die Membranlipide sind stark amphipathische Moleküle mit einem unpolaren hydrophoben „Schwanz“ und einer polaren hydrophilen „Kopfgruppe“. Sie werden in Membranen durch den hydrophoben Effekt und schwache Van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten und sind deshalb gegeneinander verschiebbar. Dies verleiht den Membranen einen mehr oder weniger flüssigen Charakter. Wie die Lipide sind auch die Proteine in der Membran beweglich. Werden sie nicht durch besondere Mechanismen festgehalten, schwimmen sie in der Lipidschicht wie in einer zweidimensionalen Flüssigkeit (Simons and Toomre, 2000). Biologische Membranen sind daher keine starren Strukturen. Lipide und viele Membranproteine sind permanent in lateraler Bewegung. Ausgehend von dieser Beobachtung entwarfen Singer und Nicolson im Jahr 1972 ein Modell für die Organisation biologischer Membranen, das *Fluid Mosaic Model* (Singer and Nicolson, 1972). Mit dem heutigen Wissen könnten Membranen auch als ein „Mosaik aus Lipid-Domänen“ beschrieben werden. Die Lipid-Doppelschicht kann in unterschiedlichen Zuständen vorliegen. Man unterteilt nach zunehmender Fluidität: die Gelphase, die liquid-ordered und die liquid-disordered Phase (Simons and Toomre, 2000). Die liquid-disordered Phase entspricht dem *Fluid Mosaic Model* von Singer und Nicolson. Die liquid-ordered Phase ist weniger flüssig und dichter gepackt. Diese Erkenntnisse führten zur Formulierung der Lipid-Raft-Hypothese, in der Mikrodomänen der liquid-ordered Phase wie Flöße auf einem See in der liquid-disordered Phase „schwimmen“. Diese Einheiten auf der Plasmamembran

werden deshalb als Lipid Rafts bezeichnet (Simons and Ikonen, 1997). Lipid Rafts entstehen und bestehen aus einem dynamischen Zusammenschluss von Cholesterin und Sphingolipiden. Die Bildung kann durch die strukturellen Eigenschaften der Membranlipide erklärt werden. Sphingolipide unterscheiden sich von anderen Phospholipiden durch ihre langen, meist gesättigten Fettsäureketten. Diese ermöglichen ein dichtes Aneinanderpacken der Sphingolipide. Es entsteht eine kristalline gelartige Phase, die Gelphase. Durch den Einbau von Cholesterinmolekülen in die Sphingolipid-Anordnung wird wiederum die laterale Mobilität erhöht. Dieser Membranzustand wird als liquid-ordered bezeichnet (Simons and Ikonen, 1997). In direkter Nachbarschaft zu den Lipid Rafts liegen vermehrt Glycerophospholipide mit mehrfach ungesättigten Fettsäureketten. Die geknickten, mehrfach ungesättigten Fettsäureschwänze dieser Glycerophospholipide verhindern eine starke Interaktion zwischen diesen Phospholipiden, so dass der Membranbereich flüssiger bleibt und als liquid-disordered bezeichnet wird. Mikrodomänen der liquid-ordered Phase „schwimmen“ in Membranbereichen der liquid-disordered Phase. In Lipid Rafts findet man viele Proteine, vor allem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine, zweifach acylierte Proteine (Proteinkinasen der Src-Familie oder die α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen), Cholesterin gekoppelte Proteine und Transmembranproteine (Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000). Bei GPI-verankerten Proteinen, die sich immer auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran befinden, bedingt der Lipid-Anker mit seinen zwei (üblicherweise) gesättigten Fettsäuren die Raft-Assoziation (Casey, 1995). Hingegen ist bei einigen Transmembranproteinen nicht geklärt, weshalb sie in Lipid Rafts lokalisiert sind. Eine Möglichkeit ist, dass die Transmembrandomäne eine Affinität für Rafts zeigt (Kundu et al., 1996).

Die Fragestellung, ob Lipid Rafts als funktionelle Einheit auf der Zellmembran tatsächlich existieren, wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Sie bewegen sich lateral in der Membranebene und verkehren fortlaufend zwischen der Membran und intrazellulären Kompartimenten (Alonso and Millan, 2001). Die meisten Erkenntnisse über die Funktion und Zusammensetzung der Lipid Rafts erhielt man durch die Anwendung biochemischer Methoden. Ein Ansatzpunkt zur Analyse der Rafts ist deren Unlöslichkeit in nicht ionischen Detergenzien wie Triton-X100 (TX100). Aufgrund ihrer geringen Dichte flottieren Lipid Rafts nach kalter Extraktion in nicht ionischen Detergenzien in einem Saccharose-Gradienten nach oben. Diese *detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membranes* (DIGs) oder *detergent resistant membranes* (DRMs) können somit von *non-resistant membranes* isoliert werden (Shogomori and Brown, 2003). Proteine, die mit den DIGs assoziiert sind, bleiben in diesen Domänen und co-flottieren im Saccharose-Gradienten nach oben. Die Charakterisierung der Rafts durch diese biochemische Methode ist jedoch begrenzt. Die DIG-Fraktion repräsentiert nicht die aktuelle Organisation der einzelnen Rafts in der

Zellmembran, sondern stellt eine Mischung aus allen vorhandenen Rafts in der Zelle dar (Mayor and Maxfield, 1995). Cholesterin ist essentiell für die Integrität der Lipid Rafts (Rietveld and Simons, 1998). Die Manipulation des Cholesteringehalts der Zelle ist demnach eine Möglichkeit, die Funktion dieser Mikrodomänen zu untersuchen. Die am häufigsten angewandte Methode ist der Entzug von Cholesterin durch Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) (Ilangumaran and Hoessli, 1998). Die Depletion von Cholesterin beeinflusst die Funktionalität der Lipid Rafts. Ihre Konsistenz wird fluider, so dass assoziierte Proteine herausdiffundieren und im Saccharose-Gradienten nicht mehr nach oben flottieren, sondern in der *non-resistant membrane*-Fraktion vorliegen.

Lipid Rafts scheinen für zelluläre Prozesse - wie die Zellkommunikation, Signaltransduktion, Endozytose, Protein- und Lipid-Sortierung - unabdingbar zu sein (Simons and Toomre, 2000). Eine Reihe von Transportproteinen ist in Lipid Rafts nachgewiesen worden mit Folgen für ihre Aktivität, ihre Regulation und ihr Trafficking. So führt die Störung der Lipid Raft-Integrität zu einer verminderten Transportaktivität von NHE3 (Murtazina et al., 2006) (Li et al., 2001), von PepT1 (Peptid-Transporter 1) (Nguyen et al., 2007), von NKCC2 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter) (Welker et al., 2008), von SERT (Serotonin-Transporter) (Magnani et al., 2004) und von PMCA (Plasmamembran-Calcium-ATPase) (Xiong et al., 2009). Die Stimulation von NHE3 mit EGF führt zu einer vermehrten Expression von NHE3 in Lipid Rafts (Li et al., 2001). Gleiches gilt für NKCC2 nach einer Stimulation mit Vasopressin (Welker et al., 2008). Des Weiteren konnte für NHE3 gezeigt werden, dass dessen Einbau in die Plasmamembran abhängig von seiner partiellen Raft-Assoziation ist (Li et al., 2001; Murtazina et al., 2006). Auf Grund der funktionellen Kopplung von NHE3 und DRA können die Erkenntnisse zur Raft-Assoziation von NHE3 als Paradigma für DRA gelten. In einer vorausgegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass DRA partiell in Rafts lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu erscheinen andere Transportproteine nicht in Lipid Rafts. CFTR ist im gesunden Gewebe nicht mit Lipid Rafts assoziiert. Während einer Infektion mit dem humanpathogenen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* nimmt die Lipid Raft-Lokalisation des CFTR-Kanals zu (Kowalski and Pier, 2004). Des Weiteren nimmt die Raft-Assoziation nach Tumornekrosefaktor α -(TNF α)-Stimulation von Wildtyp-CFTR zu, nicht jedoch von einer mutierten Form, der das PDZ-Interaktionsmotiv fehlt (Dudez et al., 2008).

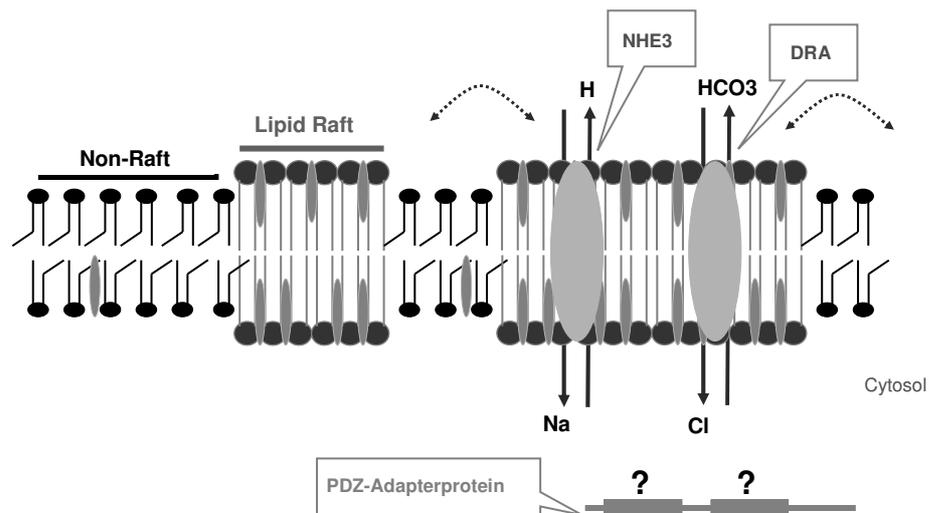


Abbildung 1.2: Partielle Raft-Lokalisation von NHE3 und DRA

NHE3 und DRA sind partiell in Rafts lokalisiert. DRA interagiert innerhalb dieser Mikrodomänen mit NHERF2, NHERF4 und vor allem mit NHERF3. Ob NHE3 innerhalb von Rafts mit den PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie interagiert, ist ungeklärt.

Ob PDZ-Adapterproteine mit Lipid Rafts assoziiert sind, ist bis heute noch nicht sicher geklärt. Besteht eine Assoziation zwischen einem PDZ-Adapterprotein und Lipid Rafts, ist die Ursache dafür noch unklar. PDZ-Adapterproteine sind weder acetyliert und palmytiliert noch tragen sie einen GPI-Anker. Es besteht die Möglichkeit, dass das PDZ-Adapterprotein durch ein in Lipid Rafts lokalisiertes Protein heranrekrutiert wird. In der Literatur sind nur wenige Arbeiten zu finden, die dieser Frage nachgehen. Die Arbeitsgruppe um Mark Donowitz, die sich intensiv mit dem Na^+/H^+ -Austauscher NHE3 beschäftigt, kam zu dem Ergebnis, dass NHERF2 und NHERF1 nicht in Lipid Rafts lokalisiert sind (Li et al., 2001), jedoch konnte in einer vorausgegangenen Diplomarbeit gezeigt werden, dass NHERF2, NHERF3 und NHERF4, nicht aber NHERF1 partiell mit Lipid Rafts assoziiert sind und DRA mit NHERF2, NHERF3 und NHERF4 innerhalb der Rafts interagiert (siehe Abbildung 1.2). Andere Arbeitsgruppen kamen zu der Auffassung, dass PDZ-Adapterproteine an sich nicht in Lipid Rafts lokalisiert sind, aber durch Proteine, die in Lipid Rafts sitzen, heranrekrutiert werden. So wird NHERF in T-Zellen an das C-terminale Src-Kinase-Bindungsprotein rekrutiert, welches mit Lipid Rafts-assoziiert ist (Itoh et al., 2002; Ruppelt et al., 2007).

1.5 RabGTPasen: Koordinatoren des intrazellulären Vesikeltransports

Durch Endozytose internalisieren Zellen extrazelluläres Material, Liganden, Membranproteine und Lipide. Die Internalisierung von Membranen der Zelloberfläche wird durch endosomale Recycling-Wege in Balance gehalten, da über diese Wege die endozytierten Proteine und Lipide teilweise zurück zur Plasmamembran transportiert werden. Diese Balance zwischen endozytotischer Internalisierung und Recycling kontrolliert die Zusammensetzung der Plasmamembran und beeinflusst diverse zelluläre Prozesse wie Zelladhäsion, Zellmigration, Zellpolarität und Signaltransduktion. Die Endozytose kann auf unterschiedliche Art erfolgen. Man unterscheidet eine von Clathrin abhängige Endozytose (z.B. Internalisierung des Transferrin-Rezeptors) oder von Clathrin unabhängige Endozytose (von Caveolae und Lipid Rafts abhängige Endozytose) (Ivanov, 2008). Unabhängig vom gewählten Endozytose-Weg wird das endozytierte Material an frühe Endosomen (early endosomes) übergeben und dort sortiert (Grant and Donaldson, 2009). Vom frühen Endosom gelangt das endozytierte Material über das späte Endosom (late endosomes) zum Lysosom, zur Degradation, zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder über recycling Endosomen (recycling endosomes) wieder zurück zur Plasmamembran. Schlüsselproteine dieses straff organisierten Vesikeltransports sind kleine GTPasen: die RabGTPasen (Grant and Donaldson, 2009).

RabGTPasen gehören zu der Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine, die aufgrund ihrer Strukturen den Proteinfamilien Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran zugeordnet werden (Grant and Donaldson, 2009). Die Rab-Proteine stellen die größte Gruppe innerhalb der Superfamilie dar. Der Name leitet sich ab von *ras-like in rat brain* (Touchot et al., 1987). Sie sind über Geranylgeranyl-Reste an ihrem C-terminalen Ende auf der zytosolischen Membranseite von Vesikeln gebunden. Die Interaktion aktiver Rab-Proteine mit Rab-spezifischen Effektorproteinen ist dann für die Koordination des Vesikeltransports entscheidend. Zum Beispiel interagieren einige Proteine mit Rab11 und sind daher bekannt als *Rab11 family-interacting proteins* (Rab11FIPs). Diese Effektorproteine interagieren wiederum mit vielen weiteren Proteinen, so dass ein Netzwerk aus Proteinen entsteht, welches den endosomalen Transport organisiert und koordiniert (Jones et al., 2006). Jedem Schritt des Reifungsprozesses nach der Internalisierung können spezifisch Rab-Proteine zugeordnet werden. Rab5 vermittelt die Endozytose von *clathrin-coated vesicles* und ist im frühen Endosom lokalisiert. Rab7 assoziiert hingegen mit dem späten Endosom und Rab11 sowie Rab4 sind in recycling Endosomen lokalisiert.

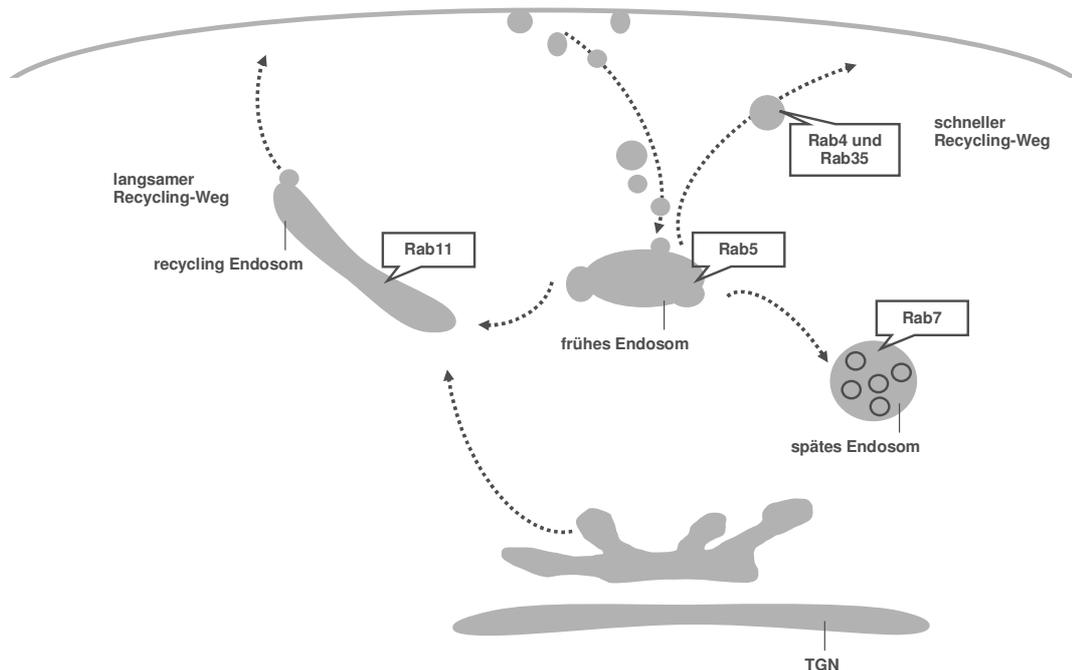


Abbildung 1.3: Recycling-Wege

Endozytiertes Material wird in frühen Endosomen (Rab5) sortiert und gelangt über einen schnellen Recycling-Weg (Rab4; Rab35) oder über einen langsamen Recycling-Weg über recycling Endosomen (Rab11) zurück zur Plasmamembran. Zur Degradation reifen frühe Endosomen zu späten Endosomen (Rab7), die mit Lysosomen verschmelzen. Modifiziert nach Grant und Donaldson, 2009.

Einige Isoformen von Rab5 wurden identifiziert: Rab5a, Rab5b und Rab5c, wobei Rab5a die bisher am ausführlichsten untersuchte Isoform ist. Diese Isoformen lassen sich alle assoziiert mit der Plasmamembran, den frühen Endosomen und Clathrin-coated-Vesikeln finden (Mohrmann and van der Sluijs, 1999). Rab5, EEA1 (early endosome antigen 1), PI3-Kinase und PtdIns3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) sind Teil des frühen Endosoms und nötig für dessen Funktion (Grant and Donaldson, 2009). Geuze et al. beschrieben 1983 das frühe Endosom als ein *compartment for the uncoupling of receptor and ligand* (CURL). Auf Grund des sauren luminalen pH-Wertes der frühen Endosomen dissoziieren internalisierte Liganden von ihren Rezeptoren, um anschließend sortiert und zu unterschiedlichen Orten in der Zelle verschickt zu werden. Proteine und Lipide können zum Wiedereinbau in die Plasmamembran schnell (schneller Recycling-Weg) oder über einen langsamen Recycling-Weg über perizentrale tubulo-vesikuläre recycling Endosomen recycelt werden. Für die Degradation reifen die frühen Endosomen zu späten Endosomen, die schließlich mit Lysosomen verschmelzen. Frühe Endosomen sind somit sehr dynamische Organellen, welche konstant eine Fusion, Sortierung oder Knospung durchlaufen. Bei späten Endosomen handelt es sich um *multivesicular bodies* (MVBs), die

Teil des degradativen Weges sind. Rab7 wird in späten Endosomen exprimiert. Es reguliert den Übergangsprozess von frühen zu späten Endosomen. Des Weiteren ist diese RabGTPase essentiell für die Fusion von Lysosomen (Mohrmann and van der Sluijs, 1999). Interessanterweise findet sich eine Mutante des Thyrotropin-Rezeptors, die nicht mit PDZ-Adapterproteinen interagieren kann, nach der Rezeptorinternalisierung nicht im recycling Endosom sondern im späten Endosom, während der Wildtyp-Rezeptor sich im recycling Endosom befindet (Lahuna et al., 2005). Das Recycling von internalisierten Proteinen und Lipiden erfolgt auf unterschiedliche Weise: auf einem langsamen oder einem schnellen Recycling-Weg. Rab11 lässt sich assoziiert mit dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und perizentralen recycling Endosomen finden (Grant and Donaldson, 2009). Diese Art des Recyclings stellt den langsamen Recycling-Weg da. CFTR und ENaC werden im Rahmen ihres Recyclings Rab11 abhängig in die Plasmamembran eingebaut (Karpushev et al., 2008; Silvis et al., 2009). Auch NHE3 wird aus Rab11-positiven Kompartimenten in die Plasmamembran eingebaut, wobei NHERF4 in dem Rab11-positiven Kompartiment zurückbleibt (Zachos et al., 2008). Rab4 und Rab35 sind GTPasen des schnellen Recycling-Weges. Rab5 reguliert den Einbau von Proteinen und Lipiden in das frühe Endosom, während Rab4 den Ausbau von Molekülen aus diesem Kompartiment fördert (Grant and Donaldson, 2009).

Die Regulation der Rab-Proteine ist ein Prozess, der einige akzessorische und regulatorische Proteine mit einbezieht. Bei RabGTPasen handelt es sich um zelluläre Schalter, die im „An-Zustand“ (GTP-gebunden) oder „Aus-Zustand“ (GDP-gebunden) vorliegen. Im Zytosol liegen sie in der inaktiven, GDP-gebundenen Form vor, fixiert mit einem Inhibitor-Protein: GDI (GDP dissociation inhibitor) (Sasaki et al., 1990). Auf Grund ihrer stark hydrophoben Geranylgeranyl-Reste benötigen Rab-Proteine dieses GDI, um aus der Membranverankerung von Kompartimenten gelöst zu werden, um im Zytosol inaktiv vorzuliegen. Dieses GDI interagiert nur mit GDP-gebundenen RabGTPasen (Rak et al., 2003). Um RabGTPasen wieder von dem GDI-Inhibitor-Protein zu lösen, werden zusätzliche Helferproteine benötigt: GDF (GDI displacement factor) (Wu et al., 2007). Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, die eine Pore bilden, welche die Insertion der RabGTPasen in die Membran ermöglicht. Um den dann möglichen Wiederausbau der RabGTPasen zu verhindern, müssen diese in die GTP-gebundene Form übergehen (Soldati et al., 1994). Der Austausch von GDP durch GTP erfolgt durch den Guanin Nukleotid Exchange Faktor (GEF). Die aktiven RabGTPasen rekrutieren spezifische Effektorproteine. Nach der Fusion des Vesikels mit der Zielmembran muss die RabGTPase wieder inaktiviert werden. Durch aktive RabGTPasen wird die Identität von Membranen festgelegt. Die Beendigung des aktiven Zustands der RabGTPasen ist obligatorisch für die Erhaltung der Identität der Zielmembran nach der Fusion von Vesikeln

mit unterschiedlicher Identität. Der Austausch von GTP durch GDP erfolgt durch ein GTPase-activating Protein (GAP). Der inaktivierte RabGTPase-GDP-Komplex wird durch Assoziation mit GDI in das Zytosol entlassen, interagiert mit GDF und ist bereit für einen neuen Zyklus.

1.6 PI3-Kinase: Ihr Einfluss auf das intrazelluläre Trafficking von Transportproteinen

Phosphoinositide (PIs) – phosphorylierte Derivate von Phosphatidylinositol (PtdIns) sind essentiell für die Regulation der Proliferation, des Zytoskeletts sowie des Signal- und Membran-Traffickings. Die PI3-Kinase phosphoryliert PtdIns sowie PIs an der 3'OH-Position des Inositol-Rings und produziert somit verschiedene Lipidprodukte (Phosphoinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P), Phosphoinositol-3,4-Diphosphat (PtdIns(3,4)P₂), Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃). Diese Lipide binden an verschiedene Proteine und kontrollieren dadurch die Aktivität dieser Signaltransduktionsmoleküle sowie deren Lokalisation und Anordnung. Säugetierzellen besitzen verschiedene PI3-Kinasen, die in drei Hauptklassen eingeteilt werden können. PI3-Kinasen der Klasse I nutzen als Substrat vorzugsweise [PtdIns(4,5)P₂] und erzeugen [PtdIns(3,4,5)P₃], sie werden auf der Grundlage ihres Aktivierungsmechanismus nochmals in Klasse Ia und Ib unterteilt. Die Unterklasse Ia wird vorzugsweise durch Rezeptor-Tyrosinkinasen oder durch Immunglobulin-Rezeptoren aktiviert, die PI3-Kinasen der Unterklasse Ib hingegen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die PI3-Kinasen der Klasse II nutzen PtdIns als ihr Substrat und bilden [PtdIns(3)P]. Diese PI3-Kinasen werden wie die der Klasse I durch extrazelluläre Stimuli aktiviert. Die PI3-Kinasen der Klasse III sind hingegen konstitutiv aktiv und nutzen als Substrat PtdIns (Lindmo and Stenmark, 2006).

PtdIns(3,4,5)P₃ ist wesentlich an der Regulation des apikalen Membranverkehrs beteiligt. Die lokale Akkumulation von [PtdIns(3,4,5)P₃] resultiert in der Rekrutierung von Effektorproteinen; so bindet die Serin/Threonin-Kinase AKT/PKB über ihre PH-Domäne an [PtdIns(3,4,5)P₃], wodurch Thr³⁰⁸ in AKT/PKB für die Proteinkinase PDK1 zugänglich und phosphoryliert wird (Sarbasov et al., 2005). Zur vollen Aktivierung muss AKT/PKB außerdem an Ser⁴⁷³ phosphoryliert werden (Aiston et al., 2006). Als klassisches Beispiel für die Regulation eines Transportproteins nach Aktivierung von AKT/PKB gilt die Translokation von GLUT4 (Cormont and Marchand-Brustel, 2001). Ein weiteres Effektorprotein ist Rac1, welches zur Familie der Rho-GTPasen gehört. Diese kleine GTPasen regulieren unter anderem die Organisation und den Umbau des Aktin-Zytoskeletts, die Zellmigration und den Vesikeltransport (Ory and Gasman, 2011). Die

Exozytose von TRPC5 (transient receptor potential ion channel) nach EGF-Stimulation erfolgt über die Aktivierung der PI3-Kinase der Klasse I und die nachgeschaltete Signalkaskade unter Beteiligung von Rac1 und Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP(5)K α) (Bezzarides et al., 2004). Im Zusammenhang mit der intestinalen NaCl-Resorption wird NHE3 auch in Abhängigkeit von der PI3-Kinase reguliert. Eine Inkubation von NHE3 stabil transfizierten PS120-Zellen mit einem synthetischen Aktivator der PI3-Kinase (Rhodamin- β -Ala-QRLFQVKGRR) oder eine Transfektion mit einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase führt zu einem gesteigerten Na⁺/H⁺-Austausch vermittelt durch NHE3 (Lee-Kwon et al., 2001). Des Weiteren hat eine Transfektion mit einer konstitutiven Akt eine gesteigerte NHE3-Aktivität zur Folge. Interessanterweise vermittelt die PI3-Kinase die Zunahme der Raft-Assoziation von NHE3 und die daraus resultierende Steigerung der NHE3-Aktivität nach EGF-Stimulation (Li et al., 2001). Parallel dazu führt eine Inhibition der PI3-Kinase zu einer Akkumulation von NHE3 in intrazellulären Kompartimenten und zu einer Abnahme der Oberflächenexpression (Kurashima et al., 1998). Eine Stimulation von Caco-2-Zellen mit LPA oder *Lactobacillus acidophilus* soll die Plasmamembranexpression von DRA über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg erhöhen (Raheja et al., 2010; Singla et al., 2010).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die elektroneutrale NaCl-Resorption erfolgt vom Dünndarm bis hin zum distalen Kolon. Dieser Ionentransport wird vorzugsweise durch DRA und NHE3 geleistet. Knockout-Mäuse, die an chronischer Diarrhöe leiden, sowie die Kongenitale Chlorid Diarrhöe heben die Bedeutung dieser beiden Transporter hervor (Hoglund et al., 1996b; Schultheis et al., 1998; Schweinfest et al., 2006). Um diese fehlerhafte NaCl-Resorption aufzuklären, ist es notwendig, die physiologische Regulation dieser Transportproteine sowie die extra- und intrazellulären Signaltransduktionen zu verstehen. In einer vorausgegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass DRA partiell in Lipid Rafts lokalisiert ist. Neben DRA ist auch NHE3 in Rafts partiell lokalisiert und diese Raft-Assoziation ist essentiell für eine normale NHE3-Aktivität sowie für dessen basales und stimuliertes Trafficking (Murtazina et al., 2006). Rafts sind von Bedeutung für die von der PI3-Kinase abhängige Exozytose sowie für die basale Endozytose von NHE3. Des Weiteren erhöht eine Stimulation mit EGF den Anteil an NHE3 in Lipid Rafts und führt zu einem gesteigerten Na⁺/H⁺-Austausch (Li et al., 2001).

Auf Grund der funktionellen Kopplung von NHE3 und DRA können die Erkenntnisse zur Raft-Assoziation und zur PI3-Kinase abhängigen Exocytose von NHE3 als Paradigma für DRA gelten.

In der vorliegenden Arbeit sollte Folgendes untersucht werden:

Ist die partielle Raft-Assoziation von DRA essentiell für den Cl⁻/HCO₃⁻-Austausch? Welche Funktion haben die PDZ-Adapterproteine in diesem Zusammenhang?

Wird DRA in Abhängigkeit von der PI3-Kinase in die Plasmamembran eingebaut? Welche Rolle spielen hierbei die PDZ-Adapterproteine? Ist die Raft-Assoziation von DRA essentiell für dessen Exozytose?

Ist die subzelluläre Verteilung von DRA abhängig von dessen PDZ-Interaktionsmotiv?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Ausgangsplasmide

Die folgenden Vektoren wurden zur Klonierung eingesetzt:

pDsRed2-C1/HA-Rab5a (Addgene plasmid 13050, Cambridge, USA)

pDsRed-C1/HA-Rab7a (Addgene plasmid 12661, Cambridge, USA)

pDsRed-C1/HA-Rab11a (Addgene plasmid 12679, Cambridge, USA)

pDsRed-C1/HA-Rab11aS25N (Addgene plasmid 12680, Cambridge, USA)

pcDNA3.1/Puromycin/DsRed-Monomer (wurde zu Beginn der Arbeit bereitgestellt)

pcDNA3.1/Puromycin/mCherry (wurde zu Beginn der Arbeit bereitgestellt)

pmCherry-C1 (wurde zu Beginn der Arbeit bereitgestellt)

2.1.2 Bakterienstämme

Die folgenden *E. coli* Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung
DH5 α	F' deoR recAI endAI hsdR1($r_k m_k^+$) supE44 1-thi gyrA96 relAI	generell bei Klonierungen
JM110	F' traD36 lacI $_q$ Δ (lacZ)M15 proA $_+$ B $_+$ / rpsL(Str $_R$) thr leu thi-1 lacY galK galT ara fhuA dam dcat supE44 Δ (lac-pro)	wenn nicht- methylierte DNA vorliegen musste

2.1.3 Kulturbedingungen für *E. coli*

Kanamycin	Stammlösung [25 mg/ml] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Ampizillin	Stammlösung [100 mg/ml] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
LB-Medium, pH 7	10 g Bacto-Trypton (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 5 g Hefeextrakt (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) 5 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) Wurde auf 1 l mit ddH ₂ O aufgefüllt und autoklaviert.
LB-Agar-Platten, pH7	10 g Bacto-Trypton (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 5 g Hefeextrakt (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) 5 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 15 g Agar-Agar (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) Wurde auf 1 l mit ddH ₂ O aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 55°C wurde die Lösung in sterile Petrischalen (Greiner-bio-one, Frickenhausen, Deutschland) gegossen. Die Agar-Platten wurden beim Abkühlen fest und konnten bei 4°C gelagert werden.
LB-Ampizillin-Platte	Selektionsplatten; vor dem Gießen wurde die LB-Agar-Lösung mit 100 mg/ml Ampizillin-Stammlösung versetzt.
LB-Kanamycin-Platte	Selektionsplatten; vor dem Gießen wurde die LB-Agar-Lösung mit 25 mg/ml Kanamycin-Stammlösung versetzt.

Die *E. coli* Bakterien wuchsen in LB-Medium bei 37°C über Nacht. Bei transformierten Bakterien wurde das LB-Medium zusätzlich mit einem Antibiotikum versetzt - Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml). 600 µl dieser Übernachtskultur wurde mit 200 µl 40% Glycerinlösung versetzt und gemischt, um bei -80°C konserviert zu werden.

2.1.4 Herstellung von kompetenten Bakterien

0,5 ml einer LB-Übernachtskultur wurde in 50 ml frisches LB-Medium (ohne Antibiotikum, siehe Kapitel 2.1.3) überführt und bis zu einer Optischen Dichte (OD) von 0,4-0,6 weiter kultiviert. Für das weitere Vorgehen wurde das ZymoBroth Kit von Zymo Research (Irvine, USA) verwendet. Die Präparation erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers. Die kompetenten Bakterien wurden schließlich in 100 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

2.1.5 Hitzeschocktransformation von *E. coli* Bakterien

Zu 100 µl kompetenten Bakterien wurden 5 µl des Ligationsproduktes (siehe Kapitel 2.1.10) pipettiert und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock, bei dem die Probe für 30 s bei 42°C und danach sofort auf Eis inkubiert wurde. Zum Reaktionsansatz wurden 300 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum, siehe Kapitel 2.1.3) zugegeben und der Ansatz für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer Selektionsplatte (siehe Kapitel 2.1.3) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.6 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung des Midipräparation-Kit von Quiagen (Hilden, Deutschland) bzw. des Minipräparation-Kit von Peqlab (pegGold Plasmid Miniprep Kit II, Erlangen, Deutschland). Für die Minipräparation wurden 5 ml, für die Midipräparation wurden 100 ml einer Übernachtskultur verarbeitet. Die Isolierung wurde gemäß den Protokollen der Hersteller durchgeführt.

Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 260 nm⁵ in einem Einkanal-UV-Vis-Spektrometer (DU-640, Beckman, Fullerton, USA). Zusätzlich wurde die Extinktion bei 280 nm⁶ gemessen, um die Reinheit der Proben bestimmen zu können. Die DNA-Lösung wurde zur Konzentrationsmessung 1:100 mit ddH₂O verdünnt. Die Leerwertbestimmung erfolgte mit der Flüssigkeit, in der die DNA gelöst war – ddH₂O. Vom jeweils ermittelten Messwert wurde der Leerwert abgezogen. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA und RNA ca. 20 µg/ml. Die tatsächliche Nukleinsäure-Konzentration ergab sich aus der Extinktion bei 260 nm multipliziert mit 50 µg/ml und dem Verdünnungsfaktor.

2.1.7 Restriktionsenzym-Verdau von DNA

Zum Restriktionsenzym-Verdau wurde mit der DNA, den benötigten Restriktionsenzymen und den entsprechenden Puffern ein Restriktionsansatz vorbereitet. Der Verdau der DNA erfolgte für zwei Stunden bei 37°C im Inkubator. Die verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer stammten von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

⁵ Absorptionsbereich der heterozyklischen und aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen

⁶ Absorptionsbereich der aromatischen Reste von Proteinen

2.1.8 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	(Gibco BRL, Paisley, Schottland)
10x TBE-Puffer	108 g Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 55 g Borsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) 4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Wurde mit ddH ₂ O auf 1l aufgefüllt. Der Puffer wurde 1:10 verdünnt verwendet.
10 mg/ml Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
SAPU-Puffer	4% Sucrose (w/v, Merck, Darmstadt, Deutschland) 0,1% SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1 mM EDTA, pH 8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,03% Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Geräte	Horizontale Gelapparatur (Peqlab, Erlangen, Deutschland) Netzgerät (Biorad, Hercules, USA)

Zur Auftrennung der DNA wurden 0,8% Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst, mit Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in eine Gelgießvorrichtung gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurden die mit 2 µl Gelladepuffer versetzten Restriktionsansätze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert.

2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Gelstück mit der entsprechenden DNA-Bande unter UV-Licht herausgeschnitten und in ein vorgewogenes Eppendorfgefäß überführt. Bei der Gelextraktion wurde die Agarose dann vollständig von der DNA entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mittels peqGOLD Gel Extraction-Kit gemäß den Angaben des Herstellers (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

2.1.10 Ligation von Vektor und Insert

Rapid DNA Ligation-Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)

2x T4 DNA Ligationspuffer (Puffer 1)

5x DNA Verdünnungspuffer (Puffer 2)

T4 DNA-Ligase (5 u/μl)

Für die Ligation wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente (siehe Kapitel 2.1.9) zunächst in einem 0,8%igen Agarosegel analysiert (siehe Kapitel 2.1.8). Anhand der Bandenintensität konnte das Verhältnis von Vektor zu Insert abgeschätzt werden. Für die Ligation wurde meistens das Verhältnis Vektor zu Insert 1:3 gewählt. Der Ligationsansatz wurde entsprechend der Tabelle 2.1 pipettiert.

Tabelle 2.2: Pipettieransatz für die Ligation

	Mock	Real
Vektor	1 μl	1 μl
Insert	-	je nach Verhältnis
T4-DNA-Ligationspuffer	10 μl	10 μl
DNA-Verdünnungspuffer	2 μl	2 μl
ddH ₂ O	Ansatz auf ein Endvolumen von 20 μl auffüllen	

Anschließend wurde der Ansatz vermischt und 1 μl T4-DNA-Ligase zugegeben. Nach erneutem Vermischen, Zentrifugieren und einer kurzen Inkubation (5 min) bei Raumtemperatur lag die DNA ligiert vor und konnte in kompetente Bakterien transformiert werden (siehe Kapitel 2.1.5).

2.1.11 In dieser Arbeit erzeugte Konstrukte

2.1.11.1 pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab5a

Um pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab5a zu erhalten, wurde zuerst DsRed2 aus pDsRed2-C1/HA-Rab5a (siehe Kapitel 2.1.1) herausgeschnitten mit den Restriktionsendonucleasen NheI und BglII. mCherry wurde aus pmCherry-C1 (siehe Kapitel 2.1.1) mittels NheI und BamHI herausgeschnitten und anstelle von DsRed2 in den Vektor kloniert. pmCherry-HA-Rab5a wurde anschließend mit AgeI und XbaI geschnitten, um mCherry-HA-Rab5a zu erhalten. DsRed-Monomer wurde aus

pcDNA3.1/Puromycin/DsRed-Monomer (siehe Kapitel 2.1.1) mittels AgeI und XbaI herausgeschnitten und durch mCherry-HA-Rab5a ersetzt.

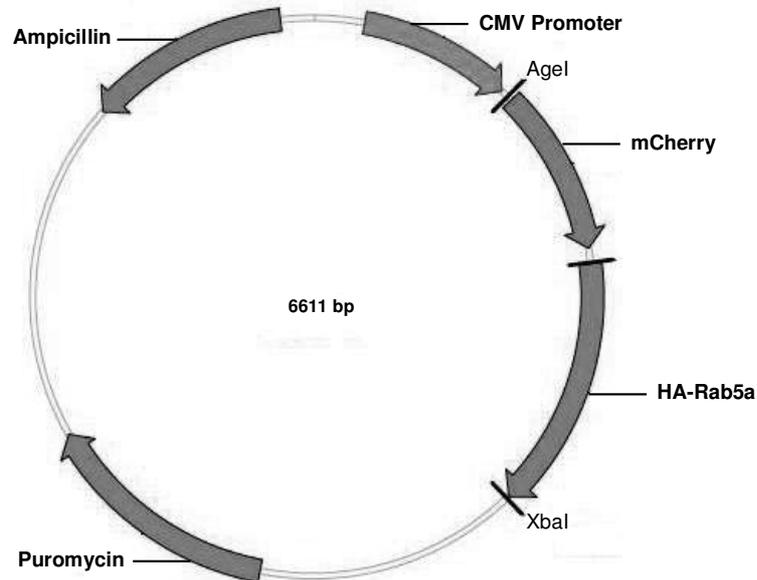


Abbildung 2.1: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab5a

2.1.11.2 pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab7a & pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11a

Um pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab7a und pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11a zu erhalten, wurde die gleiche Klonierungsstrategie verfolgt. DsRed wurde aus pDsRed-C1/HA-Rab7a und pDsRed-C1/HA-Rab11a mit den Restriktionsendonucleasen AgeI und XhoI herausgeschnitten. mCherry wurde aus pmCherry-C1 (siehe Kapitel 2.1.1) mittels AgeI und XhoI herausgeschnitten und anstelle von DsRed in die Vektoren kloniert. pmCherry-HA-Rab7a und pmCherry-HA-Rab11a wurden anschließend mit AgeI und XbaI geschnitten, um mCherry-HA-Rab7a und mCherry-HA-Rab11a zu erhalten. DsRed-Monomer wurde aus pcDNA3.1/Puromycin/DsRed-Monomer (siehe Kapitel 2.1.1) mittels AgeI und XbaI herausgeschnitten und durch mCherry-HA-Rab7a und mCherry-HA-Rab11a ersetzt.

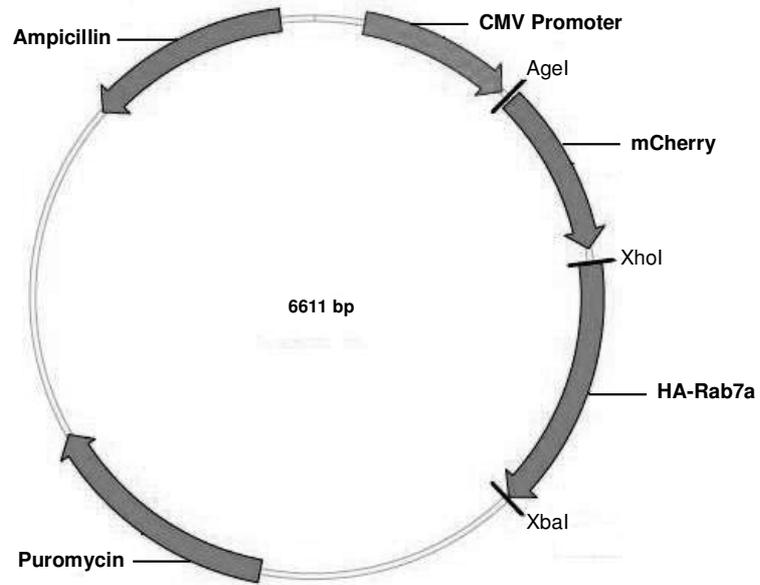


Abbildung 2.2: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab7a

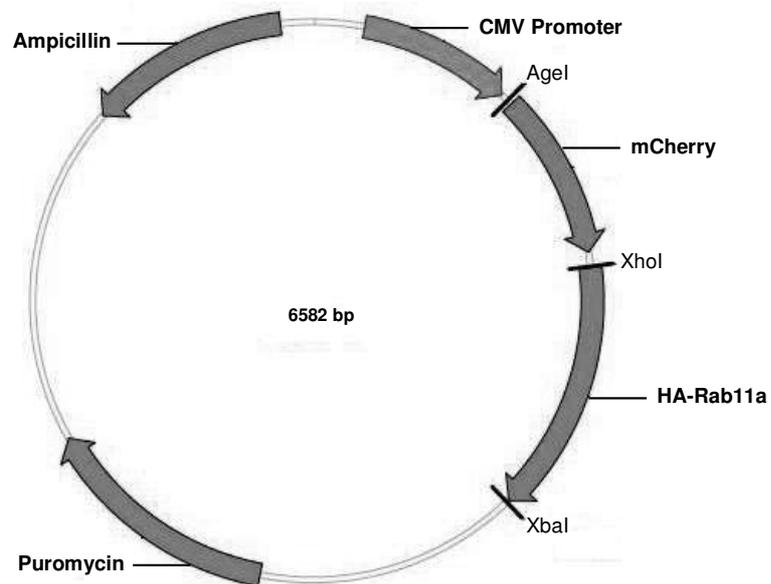


Abbildung 2.3: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11a

2.1.11.3 pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11aS25N

Um pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11aS25N zu erhalten, wurde HA-Rab11aS25N aus pDsRed-C1/HA-Rab11aS25N (siehe Kapitel 2.1.1) herausgeschnitten mit den Restriktionsendonucleasen HindIII und XbaI und in pcDNA3.1/Puromycin/mCherry subkloniert (siehe Kapitel 2.1.1).

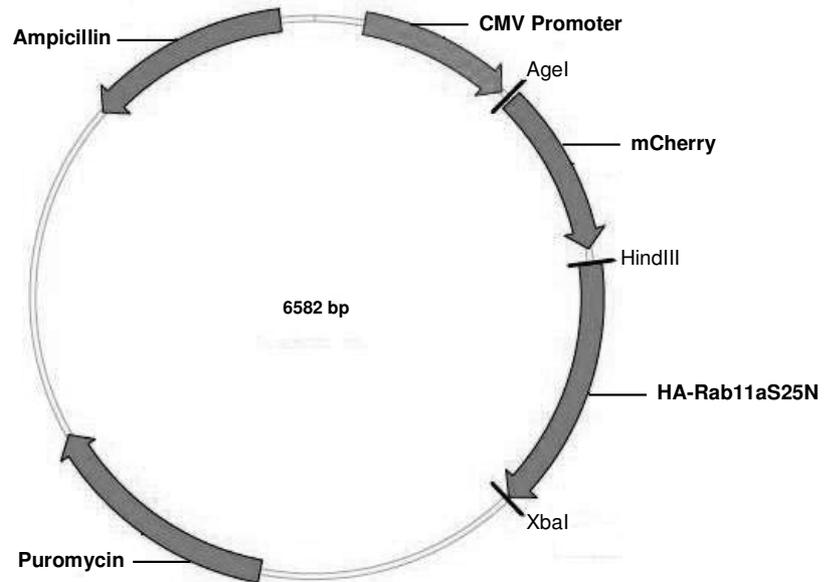


Abbildung 2.4: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11aS25N

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Paisley, Schottland) mit GlutaMax I, 4500 mg/l D-Glukose, Sodium Pyruvat und L-Glutamin
Fötales Kälberserum	FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Trypsin	0,05% Trypsin bzw. 0,25% Trypsin und 0,53 mM EDTA x 4 Na ⁺ in Hanks' Balances Salt Solution (Invitrogen, Paisley, Schottland)
D-PBS ⁻	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Invitrogen, Paisley, Schottland), ohne Calcium und Magnesium
D-PBS ⁺	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Invitrogen, Paisley, Schottland), mit Calcium und Magnesium
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (P/S) (Invitrogen, Paisley, Schottland) Zeozin (Invitrogen, Paisley, Schottland) G418 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) Hygromycin (Invitrogen, Paisley, Schottland) Puromycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) Doxycyclin (Invitrogen, Paisley, Schottland)

2.2.1.1 HEK

HEK-Zellen wurden in 25 cm²- bzw. 50 cm²- Gewebekulturflaschen in DMEM und Zusatz von 0,5% P/S und 10% FCS kultiviert und in einem befeuchteten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Subkultivierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt. Es folgte ein kurzer Waschschrift mit PBS⁻ und Zugabe von 2 ml 0,05% Trypsin. Nach Ablösung der Zellen wurden sie im Regelfall in 6 ml Medium aufgenommen und je nach Passageverhältnis auf entsprechend viele vorbereitete 25 cm²- bzw. 50 cm²- Gewebekulturflaschen verteilt.

2.2.1.2 HEK/EGFP-DRA; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus

Diese HEK-Zellen, die zu Beginn der Arbeit schon zur Verfügung standen, sind stabil mit EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus transfiziert. Diese Konstrukte unterscheiden sich lediglich durch die vier Aminosäuren Glutaminsäure (E), Threonin (T) Lysin (K) und Phenylalanin (F), die das PDZ-Interaktionsmotiv am C-terminalen Ende von DRA darstellen und bei EGFP-DRA-ETKFminus fehlen. HEK/EGFP-DRA- bzw. HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen wurden in 25 cm²- bzw. 50 cm²-Gewebekulturflaschen in DMEM und Zusatz von 10% FCS, 0,5% P/S, 500 µg/ml G418 und 400 µg/ml Zeozin kultiviert. Die Subkultivierung dieser Zellen erfolgte nach demselben Prinzip wie bei den HEK-Zellen.

Am Tag einer Transfektion wurde den Zellen das Medium abgesaugt. Anschließend wurden sie kurz mit PBS⁻ gewaschen und dann in antibiotikafreies Medium mit 10% FCS aufgenommen. Die weiteren Schritte der Transfektion siehe Kapitel 2.2.1.4.

2.2.1.3 Caco-2/BBE/EGFP-DRA; Caco-2/BBE/EGFP-DRA-ETKFminus

Diese mit EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus stabil transfizierten Caco-2/BBE Zellen wurden zu Beginn dieser Arbeit bereitgestellt. Caco-2/BBE/EGFP-DRA- bzw. Caco-2/BBE/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen wurden in 50 cm²- Gewebekulturflaschen in DMEM und Zusatz von 10% FCS, 0,5% P/S, 250 µg/ml G418, 50 µg/ml Zeozin und 200 µg/ml Hygromycin kultiviert.

Zur Subkultivierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS⁻ wurde 3 ml 0,25% Trypsin zugegeben und sieben Minuten inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurden diese in 10 ml Medium aufgenommen und je nach Passageverhältnis auf entsprechend viele vorbereitete 50 cm²- Gewebekulturflaschen verteilt.

Den Zellen wurde alle zwei Tage 20 ng/ml Doxycyclin zugegeben zur Unterdrückung der EGFP-DRA- bzw. EGFP-DRA-ETKFminus-Expression. EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurden in Form eines Tet-Off-Systems stabil transfiziert (Lamprecht et al., 2009). Durch dieses Tet-Off-System (Tetracyclin-off) kann die Transgenexpression zeitlich kontrolliert werden. Ein Komplex aus Tetracyclin oder dessen Derivat Doxycyclin und dem Tetrazyklin abhängigen Transaktivator tTA inhibiert die Aktivität des TRE- (Tetracycline responsive element) Promoters des zu regulierenden Zielgens (EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus). Dieses System wird erst durch den Entzug von Tetracyclin oder Doxycyclin eingeschaltet. 10 Tage vor Versuchsbeginn wurde den Zellen immer Doxycyclin entzogen, um die EGFP-DRA- bzw. EGFP-DRA-ETKFminus-Expression zu starten.

2.2.1.4 *Transiente und stabile Transfektion*

Lipofectamine 2000	(Invitrogen, Paisley, Schottland)
Opti-MEM	Reduces serum medium mit GlutaMax I (Invitrogen, Paisley, Schottland)
DMEM	(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Paisley, Schottland), mit GlutaMax I, 4500 mg/l D-Glucose und Sodium Pyruvat. Zusatz von 10% Kälberserum (Fetal Bovine Serum (FCS), Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Klonierungsringe	(Medium, BelArt Products, New Jersey, USA)

Für die Transfektion wurden 70% konfluente Zellen eingesetzt. In ein Eppendorfgefäß mischte man 5 µg der gewünschten DNA mit Opti-MEM. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden 10 µl Lipofectamin 200 mit 250 µl Opti-MEM vermischt. Nach 5 min vereinte man beide Ansätze und inkubierte den Transfektionsansatz für 30 min. Nach Ablauf der Zeit versetzte man die Zellen mit dem Transfektionsansatz und antibiotikafreiem Medium. Die Zellen wuchsen weitere 24 h und konnten dann für Versuche eingesetzt werden. Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen nach 24 h verdünnt und selektiert, um Klone zu erhalten. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden kurz mit PBS⁻ gewaschen und trypsinisiert. Nach Ablösung der Zellen wurden sie in Selektionsmedium (antibiotikahaltig) aufgenommen. Es folgte eine Verdünnung der Zellen, so dass in 30 cm²- Petrischalen einzelne Klone heranwuchsen. Diese Klone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen gepickt.

2.2.2 **Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid**

Cycloheximid Stammlösung [25 mg/ml] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Cycloheximid inhibiert die Proteintranslation und kann für die Analyse der Halbwertszeit von Proteinen genutzt werden. HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen wurden für 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 9 h in cycloheximidhaltigem Medium (25 µg/ml Cycloheximid) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert in 1000 µl Lysis-Puffer (siehe Kapitel 2.3.1). Zellkerne und Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 10000 g bei 4°C für 10 min abgetrennt und das klare Lysat für die SDS-Gelelektrophorese aufbereitet (siehe Kapitel 2.3.3). Nach erfolgter SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion wurde die Bandenintensität von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus quantifiziert mittels ImageMaster 1D, Version 3.0 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Der

prozentuale Anteil der mittleren Bandenintensität vom Ausgangswert bei 0 h (=100%) wurde berechnet.

2.2.3 Störung der Raft-Integrität durch Methyl- β -Cyclodextrin

Methyl- β -Cyclodextrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Zur Cholesterindepletion wurden die Zellen in einem von Antibiotika und FCS freien Medium, das Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) und Albumin (0,2%) enthielt, für 60 min inkubiert. HEK-Zellen wurden mit 1 mM MCD inkubiert, während Caco-2/BBE-Zellen mit 20 mM MCD inkubiert wurden. Eine höhere Konzentration als 1 mM MCD wurde von HEK-Zellen nicht toleriert.

2.2.4 Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002

LY294002 Stammlösung [50 mM/ml] (Invitrogen, Paisley, Schottland)

LY294002 ist ein reversibler Inhibitor der PI3-Kinase, welcher die ATP-Bindungsstelle der PI3-Kinase beeinflusst. Zur Inhibition der PI3-Kinase wurden die Zellen mit 50 μ M LY294002 für 30 min bei 37 °C in dem von Antibiotika und FCS freien Medium inkubiert.

Um sicherzustellen, dass durch die Inkubation mit LY294002 die PI3-Kinase in ihrer Aktivität gehemmt wird, wurde der Phosphorylierungsstatus eines Zielproteins der PI3-Kinase untersucht – Akt. Akt befindet sich in einem aktiven Zustand, sobald die Phosphorylierungsstellen Threonin-308 und Serin-473 phosphoryliert vorliegen. Einige HEK-Zellen wurden nach Inkubation mit LY294002 nicht für funktionelle Messungen bzw. Oberflächenbiotinylierung eingesetzt, sondern lysiert (siehe Kapitel 2.3.1), um den Phosphorylierungsstatus von Akt zu untersuchen mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion (siehe Kapitel 2.3.5).

2.2.5 Fluorometrie

Standard-Puffer

- 5 mM Kaliumgluconat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2 mM Magnesiumgluconat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 1 mM Calciumgluconat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 10 mM HEPES (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 mM Glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Puffer 3 plus 115	115 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 25 mM NaHCO ₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1 l Standard-Puffer; Puffer wurde mit Carbogen (5 % CO ₂ ; 95 % O ₂) begast; pH 7,45-7,5.
Puffer 4	115 mM NaGlc (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 25 mM NaHCO ₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1 l Standard-Puffer; Puffer wurde mit Carbogen begast; pH 7,45-7,5.
Puffer 3 plus 30	30 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 85 mM NaGlc (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 25 mM NaHCO ₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1 l Standard-Puffer; Puffer wurde mit Carbogen begast; pH 7,45-7,5
Kalibrationspuffer	100 mM KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 40 mM TMA-Cl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1 l Standard-Puffer; Puffer wurde mit 100% O ₂ begast; pH 7,0 bzw. 7,5. Puffer pH 7,0 wurde mit Nigericin (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt. Puffer pH 7,5 wurde mit Nigericin (1:2000, Sigma-Adlrlich, St. Louis, USA) versetzt.
BCECF AM	2',7'-Bis-(2-Carboxy-Ethyl)-5-(-6)-Carboxy-Fluorescein (Molecular Probes, Paisley, Schottland)
Geräte	Durchflussküvette (Kammervolumen 250 µl, Durchfluss 3 ml/min) Glas-Coverslips (Thomas Scientific, Swedesboro, USA) Osmometer (Roebing; Berlin, Deutschland) Ratio-Fluorometer (LS55, Perkin Elmer) Software FLWinLab

Von den Puffern wurde zur Kontrolle die Osmolarität gemessen. Diese musste zwischen 295 und 305 mosmol/l liegen.

Die Aktivität von DRA bzw. DRA-ETKFminus wurde als intrazelluläre Alkalinisierung nach Entzug von extrazellulärem Chlorid und Wiederreazidifizierung nach Wiedertzugabe von extrazellulärem Chlorid gemessen mittels Fluorometrie. Zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes wurde 2',7'-Bis(2-Carboxylethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein (BCECF) als spezifischer Fluoreszenzindikator eingesetzt. BCECF ändert seine Excitationscharakteristika, wenn sich Protonen reversibel an das Molekül binden. BCECF wird bei 456 nm und bei 495 nm angeregt, das Maximum des emittierten Lichtes liegt bei 535 nm. Die Bindung von Protonen an das BCECF-Molekül bewirkt eine Abnahme der BCECF-Fluoreszenz bei der Anregungswellenlänge von 495 nm und eine Zunahme der Lichtemission bei der Anregungswellenlänge von 456 nm.

Für die funktionellen Untersuchungen wurden die Zellen auf Glas-Coverslips ausgesät und am Versuchstag mit 10 μ M BCECF-AM 20 min bei 37°C gefärbt. Hierzu wurde 1 μ l BCECF-Stammlösung (10 mM) mit 1 ml Puffer 3 plus 115 vermischt und ein Glas-Coverslip mit der Zellseite nach oben in die Lösung gelegt. Die angefärbten Zellen auf dem Glas-Coverslip wurden in die Durchflussküvette luftblasenfrei eingesetzt und in das Fluorometer eingebaut. Die Puffer umspülten mit einem konstanten Fluss von 3 ml/min die Zellen. Zu Beginn der Messung floss exakt 300 s Puffer 3 plus 115 durch die Küvette, es folgte 300 s Puffer 4 und 300 s Puffer 3 plus 30. Am Ende der Messung wurden die Zellen mit den Kalibrationspuffern 7,0 und 7,5 umspült, um die Messung mit der "high-K plus Nigericin"-Technik zu kalibrieren (Lamprecht et al., 2005; Lamprecht et al., 2006; Lamprecht et al., 2009). Die Probe wurde während des Experiments abwechselnd mit 438 nm und 482 nm angeregt und die entsprechende Emissionsintensität bei 530 nm alle 2,9 s festgehalten.

2.2.6 Präparation von *detergent-resistant membranes*

TNE-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 7,5 (Merck, Darmstadt, Deutschland) 150 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 5 mM EDTA*4Na ⁺ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
TNE-TX100	1% Tiron-X100 (TX100) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in TNE-Puffer
Sucrose-Lösungen	5%-, 30%-, 80%- Sucrose (w/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in TNE-Puffer
72% Trichloressigsäure	TCA (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,15% Na-Deoxycholat	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Aceton	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Geräte	Ultrazentrifuge (Optima-L70, Beckman, Krefeld, Deutschland) Ausschwingrotor SW41Ti (Beckman, Krefeld, Deutschland) Ultrazentrifugenröhrchen (Ultra centrifuge tubes 14*89mm, Beckman, Krefeld, Deutschland) Glashomogenisator 1 ml (nach Dounce, Sarotrius, Göttingen, Deutschland)

Für die Präparation von Detergenzien-resistenten Membranen wurden Zellen verwendet, die in einer 50 cm²- Gewebekulturflasche herangewachsen waren und sich in einem konfluenten Zustand befanden. Der gesamte Vorgang der Isolierung erfolgte bei 4°C mit gekühlten Puffern und Materialien. Den Zellen wurde das Medium abgesaugt. Nach zwei kurzen Waschschritten mit kaltem PBS⁻ wurden sie in 2 ml TNE-Puffer mit 1% TX100 lysiert. Das Zelllysat wurde in einen 1-ml-Glashomogenisator überführt und mit zehn Stößen homogenisiert. Zur Aufschichtung des Sucrose-Gradienten wurde das Homogenisat (2 ml) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml 80% Sucrose-Lösung gemischt, so dass eine 40% Sucrose-Lösung vorlag. Diese wurde mit 4 ml 30% und 4 ml 5% Sucrose-Lösung überschichtet. Die austarierten Zentrifugenröhrchen wurden 19 Stunden bei 190000 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden zwölf 1-ml-Fraktionen von oben beginnend (Fraktion 1) dem Zentrifugenröhrchen entnommen (Brown and Rose, 1992).

Mit diesen zwölf Fraktionen wurde eine Trichloressigsäure-Präzipitation durchgeführt. Zu den einzelnen Fraktionen der Lipid Raft Fraktionierung wurden 100 µl 0,15% Na⁺-Deoxycholat-Lösung gegeben (Endkonzentration 0,015%) und gevortext. Die Lösung musste anschließend 10 min bei Raumtemperatur ruhen. Darauf folgend wurden 100 µl 72% Trichloressigsäure-Lösung hinzugegeben (Endkonzentration 7,2%), wiederum gevortext und für 20 min bei 4°C die Proteine gefällt. Nach anschließendem Zentrifugieren (15 min, 10000 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Aceton aufgenommen und gründlich durchmischt. Insgesamt wurde dreimal mit Aceton gewaschen, nach jedem Waschgang wurde der Überstand abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm, 4°C). Nach dem letzten Waschschriff wurde das Pellet an der Luft getrocknet (ca. eine Stunde) und für die SDS-Gelelektrophorese aufbereitet (siehe Kapitel 2.3.3).

2.2.7 Oberflächenbiotinylierung

Sulfo-NHS-SS-Biotin	(Pierce, Rockford, USA)
NeutrAvidin Agarose	(Pierce, Rockford, USA)
Boratpuffer pH 9	154 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 10 mM Borsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 7,2 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1,8 mM CaCl ₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Biotinylierungslösung	1mg Sulfo-NHS-SS-Biotin/ml in Boratpuffer
Quenchingpuffer pH 7,4	25 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 120 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1,08 mM CaCl ₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Lysis-Puffer	100 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) 50 mM NaF (Merck, Darmstadt, Deutschland) 20 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Lämmli-DTT-Puffer	siehe Kapitel 2.3.3

Alle Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C im Kühlraum. Die verwendeten Zellen wurden zweimal mit PBS⁺ und einmal mit Boratpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte zweimal eine Inkubation mit 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin in Boratpuffer für je 30 min. Zum Absättigen von freien Biotinbindungsstellen wurden die Zellen einmal gewaschen mit Quenchingpuffer und für 5 min in diesem Puffer inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS⁻ wurden die Zellen lysiert in 750 µl Lysis-Puffer. Nach Abtrennung von Zellkernen und Zellresten (Zentrifugation bei 10000 g, 4°C, 10 min) inkubierte man das Zelllysate mit 100 µl NeutrAvidin Agarose über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligem Waschen der Agarose wurden die biotinylierten Proteine eluiert mittels 2* Lämmli-DTT-Puffer (200 µl). Nach erfolgter SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion wurde die Bandenintensität von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus quantifiziert mittels ImageMaster 1D, Version 3.0 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die relative Veränderung der Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität des biotinylierten DRA und DRA-ETKFminus zu der Bandenintensität des gesamten EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus im Lysat.

2.2.8 Isolation von Rab-haltigen Vesikeln

2.2.8.1 Präparation eines post-nuclear-supernatant und einer mit Endosomen angereicherten Fraktion

Homogenisierungspuffer 250 mM Sucrose (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

3 mM Imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

pH 7,4

Sucrose-Lösungen 40% & 35% Sucrose-Lösung (w/v, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
in Homogenisierungspuffer

Geräte Ultrazentrifuge (Optima-L70, Beckman, Krefeld, Deutschland)

Ausschwingrotor SW41Ti (Beckman, Krefeld, Deutschland)

Ultrazentrifugenröhrchen (Ultra centrifuge tubes 14*89mm,
Beckman, Krefeld, Deutschland)

Glashomogenisator 5 ml (nach Dounce, Sarotrius, Göttingen,
Deutschland)

Für die Isolation von Endosomen wurden Zellen verwendet, die in einer 60 cm²-Gewebekulturpetrischale herangewachsen waren und sich in einem konfluenten Zustand befanden. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS⁻ gewaschen, vorsichtig mit einem Zellschaber von der Petrischale abgelöst und in 1 ml PBS⁻ aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde anschließend in ein 15-ml-Falcon (BD, Franklin Lakes, USA) überführt. Insgesamt wurden Zellen von insgesamt 8 Zellkulturschalen in einem Falcon vereinigt. Nach Zentrifugation (1000 g, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet vorsichtig in Homogenisierungspuffer aufgeschwemmt und resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1500 g, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 3 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und die Zellen mittels eines Glashomogenisators mit zehn Stößen aufgebrochen. Ein Aufbrechen der Zellkerne sollte vermieden werden, da freiwerdende DNA zu einem Verkleben der Zellorganellen führt. Ein *post-nuclear-supernatant* (PNS) wurde schließlich durch eine erneute Zentrifugation (1500 g, 15 min, 4°C) gewonnen. Dieser milchtrübe postnukleäre Überstand diente dann zur Herstellung des mit Endosomen angereicherten Ausgangsmaterials.

Zur Aufschichtung des Sucrose-Gradienten wurden 4 ml 40% Sucrose-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 4 ml 35% Sucrose-Lösung sowie mit 2 ml postnukleärem Überstand, welcher mit einer 40% Sucrose-Lösung gemischt wurde, so

dass eine 20% Sucrose-Lösung vorlag, überschichtet. Dieser diskontinuierliche Sucrose-Gradient wurde nachfolgend für 3 h bei 4°C mit 108000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die mit Endosomen angereicherte 20%/35%-Interphase von oben beginnend dem Zentrifugenröhrchen entnommen. Dieses mit Endosomen angereicherte Ausgangsmaterial wurde für die Immunisolierung eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.8.2; siehe Abbildung 2.5).

2.2.8.2 Immunisolation von endosomalen Membranen

HA Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Katalognr. A2095)

Lämmli-DTT-Puffer siehe Kapitel 2.3.3

Die durch die Dichten-Gradienten-Zentrifugation (siehe Kapitel 2.2.8.1) gewonnene, mit Endosomen angereicherte Fraktion (20%/35% Interphase) wurde mit 25 µl HA-gekoppelter Agarose versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren (1 min, 1000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt (nicht gebunden) und die Agarose dreimal mit PBS⁻ gewaschen. Nach jedem erfolgten Waschgang wurde der Überstand abzentrifugiert (1 min, 1000 g, 4°C) und verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Agarose in 200 µl 2*Lämmli-DTT-Puffer aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Antikörper-Antigen-Bindung zu lösen. Nach erfolgter SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion wurde die Bandenintensität von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen quantifiziert mittels ImageMaster 1D, Version 3.0 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Der relative Anteil von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen, den man isoliert hatte, wurde ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen zu der Bandenintensität des gesamten EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen in der mit Endosomen angereicherten Fraktion (20%/35% Interphase; Fraktion 2).

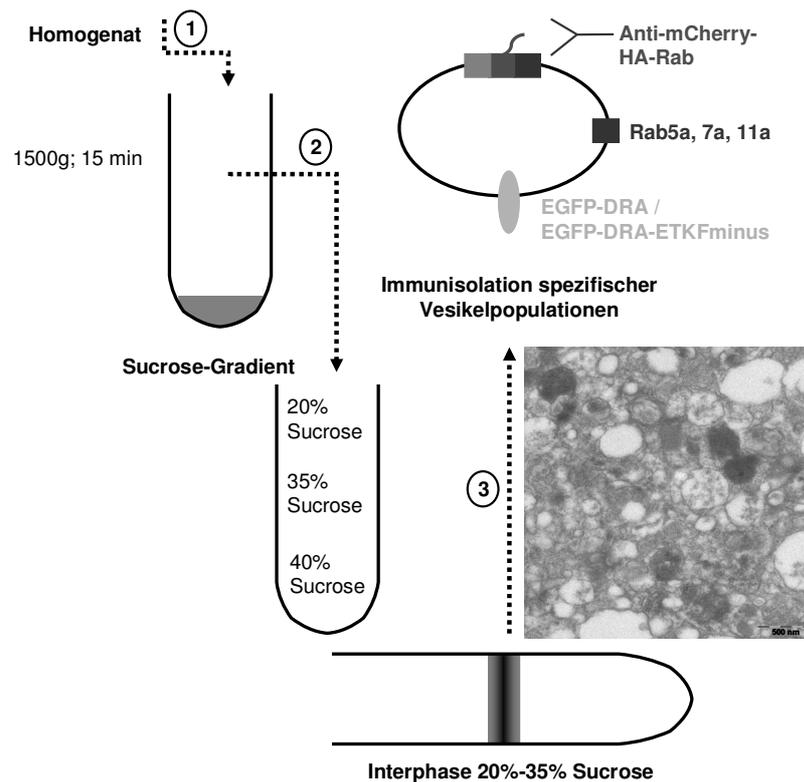


Abbildung 2.5: Gewinnung eines mit Endosomen angereicherten Ausgangsmaterials und Immunisolierung von Rab5a-, Rab7a- und Rab11a-haltigen Vesikeln

Endosomen wurden isoliert aus HEK-Zellen, die stabil EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus sowie mCherry-HA-Rab5a, -7a & -11a exprimieren. Nach Homogenisation der Zellen wurde das Homogenisat nach Abtrennung von Zellkernen und Zellresten auf einen Sucrose-Gradienten aufgetragen (1). Nach Ultrazentrifugation (2) wurden Endosomen mittels HA-gekoppelter Agarose isoliert (3).

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

4% Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dapi 4'6-diamidino-2-phenylindole [10 µg/ml] in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Fluor Save™ Reagent (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)

Geräte ApoTome (Zeiss, Jena, Deutschland)

Für die Fluoreszenzmikroskopie wuchsen die Zellen auf Glasplättchen. Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und anschließend in 4% Formaldehyd fixiert (15 min). Kurzes Schwenken der Glasplättchen in PBS⁻ beendete die Fixierung. Für die Kernfärbung wurden die Zellen anschließend mit 10 µg/ml Dapi in PBS⁻ für 7 min gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS⁻ wurden die Zellen unter Verwendung von Fluor Save™ Reagent eingedeckelt. Nach kurzer Trocknung im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Präparate bei 4°C gelagert, bis sie an einem ApoTome mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x) bzw. einem Planobjektiv (20x) betrachtet wurden. Bei

dem ApoTome handelt es sich um eine Alternative zum konfokalen Mikroskop um optische Schnitte eines Präparates zu erhalten. Grundlage des ApoTomes ist die „strukturierte Beleuchtung“. Hierbei wird eine Gitterstruktur in den Fluoreszenz-Strahlenganges eingebracht. Diese Gitterstruktur wird in der Objektebene scharf abgebildet. Ein Scanning-Mechanismus sorgt zunächst für einen definierten Versatz dieser Gitterstruktur in der Präparatebene. In jeder Gitterposition wird schließlich ein Bild aufgenommen, die zu einem Bild verrechnet werden. Schließlich erhält man einen präzise optischen Schnitt durch das Präparat (Schaefer et al., 2004). Für die Co-Lokalisationsanalyse von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus (Emission 509 nm) mit mCherry-HA-Rab5a, -7a bzw. -11a (Emission 610 nm) wurde ein Ölimmersionsobjektiv verwendet (Plan Apochromat: 63x Vergrößerung, Numerische Aperatur 1,4). Die Pixelgröße der aufgenommenen Bilder betrug 100 x 100 nm, dies korreliert sowohl mit der theoretischen maximalen Auflösung von EGFP und mCherry (90 nm und 109 nm) als auch mit der Größe von endosomalen Vesikeln (100-200 nm). Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde mit der AxioVision Software 4.8.2 bestimmt.

2.3 Proteinanalytische Methoden

2.3.1 Proteinisolierung

Lysis-Puffer pH 7,5	100 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
	50 mM NaF (Merck, Darmstadt, Deutschland)
	20 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
10% Triton-X100	(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
PI-Cocktail	Protease-Inhibitoren-Cocktail complete Mini, EDTA-free (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Die zu lysierenden Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und mit 1000 µl Lysis-Puffer versetzt, danach mittels einer Spritze aufgebrochen und bei 4°C für 20 min geschüttelt. Nach Abtrennung von Zellresten und Zellkernen durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 g wurde das klare Lysat bei -20°C gelagert oder für die SDS-PAGE aufbereitet (siehe Kapitel 2.3.3).

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)

Gerät Microplate Reader Model 550 (BioRad, Hercules, USA)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde der BCA-Assay von Pierce angewandt. Diese Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Biuret-Reaktion. Proteine bilden in einem alkalischen Milieu mit Cu^{2+} einen Komplex. Die Cu^{2+} dieses Komplexes werden zu Cu^{1+} reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 595 nm photometrisch gemessen. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin in Konzentrationen von 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mg/ml. Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurden 25 μl der Probe bzw. des BSA-Standards mit 200 μl BCA-Reagenz gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der Eichgeraden.

2.3.3 SDS-PAGE

30% Acrylamidlösung Rothiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1,5 M Tris-Base pH 8,8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

1 M Tris-Base pH 6,9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

10% Sodiumdodecylsulfat SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

10% Ammoniumpersulfat APS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Temed N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

4*Lämmli-DTT-Puffer für 10 ml Lösung:

2,5 ml 1,5 M Tris-Base pH 6,8, 4 ml Glycerol (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,8 g SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2 g DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Krümel von Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

5*Laufpuffer pH 8,3 124 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 959 mM Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,5% (w/v) SDS

(Sigma-Adlrich, St. Louis, USA) Zur Verwendung wurde der Puffer 1:5 verdünnt.

Protein-Standards

(BioRad, Hercules, USA) Katalognr.: 161-0374

Geräte

Vertikale Gelapparatur Mini-Protean III (Biorad, Hercules, USA)

Netzgerät

(Biorad, Hercules, USA)

Tabelle 2.3: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei 1,5 mm Geldicke

	Trenngel (8,5%)	Trenngel (5,0%)
Wasser	4,5 ml	3,4 ml
1,5 M Tris-Base pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris-Base pH 6,8	-	626 µl
30% Acrylamid-Lösung	2,8 ml	850 µl
10% SDS-Lösung	100 µl	50 µl
10% APS-Lösung	80 µl	50 µl
Temed	10 µl	5 µl

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine geeignete Methode, um Proteine im elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen. Eine Vorbehandlung des zu trennenden Proteingemisches mit SDS sorgt dafür, dass für die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld nur noch deren Masse ausschlaggebend ist. SDS zerlegt oligomere Proteine in ihre Untereinheiten und denaturiert diese. An diese entfalteten Peptidketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Dadurch tritt die Eigenladung der Proteine in den Hintergrund und sie werden allein aufgrund ihres Molekulargewichts getrennt. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine gibt man zusätzlich zum SDS noch Thiole hinzu, um Disulfid-Brücken im Protein zu spalten.

Die aufzutragenden Proben wurden mit einem adäquaten Volumen an 4*Lämmli-DDT-Puffer versetzt, um 1*Lämmli-DDT-Puffer zu erhalten. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde das zuvor gegossene Polyacrylamid-Gel (8,5% Trenngel und 5% Sammelgel) beladen (siehe Tabelle). Die Elektrophorese erfolgte in 1*Laufpuffer bei 110 V für ca. 1 1/2 Stunden.

2.3.4 Western Blotting

Transferpuffer	25 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 191 mM Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,034% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 20% (v/v) Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Membran Immobilon-FL	(Millipore, Billerica, USA)
Gel-Blotting-Papier	(Whatman, Kent, England)
Geräte	Mini-Trans-Blot (Biorad, Hercules, USA) Netzgerät (Biorad, Hercules, USA)

Zum Transfer gelelektrophoretisch getrennter Proteine auf die Nitrocellulose-Membran eignen sich zwei Arten des Western Blots – Semi-dry oder Wet Western Blot. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Wet Western Blot angewandt.

Die Nitrocellulose-Membran wurde kurz durch Methanol gezogen und anschließend in dem Transferpuffer getränkt. Ebenso wurden zwei Blatt Filterpapier in entsprechender Größe zum Gel sowie die zur Apparatur gehörigen Schwämme in dem Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde für 5 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Der Blot-Stapel wurde im Transferpuffer „schwimmend“ aufgebaut. Auf den untersten Schwamm wurde eines der Filterpapiere gelegt. Darauf folgten das Gel, die Membran und das zweite Filterpapier. Den Schluss bildete der zweite Schwamm. Dieser Stapel wurde in einem Plastikeinsatz fixiert und in die Blot-Kammer gestellt, so dass die „Membran-Seite“ des Stapels zur Anode, die „Gel-Seite“ zur Kathode gerichtet war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 20 V und 4°C. Nach dem „Blotten“ wurde die Membran direkt blockiert (siehe Kapitel 2.3.5) oder in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

2.3.5 Immundetektion

10*TBST-Puffer pH 7,5	150 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 20 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,1% (v/v) Tween 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) Zur Verwendung wurde der Puffer 1:5 verdünnt.
Milchpulver	5% in TBST (Bio Milchpulver, fettarm, Spinnrad, Bad Segeberg, Deutschland)
Gerät	LI-COR Odyssey Infrared imaging system (LI-COR, Lincoln, USA)

Tabelle 2.4: Primärantikörper – für die Immundetektion und Immunisolation

Primäre-antikörper, Spezies	Blockierung in TBST	Verdünnung	Firma
α -EGFP, Maus	5% Milchpulver	1:500	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, Nr. 632381
α -mCherry, Maus	5% Milchpulver	1:1000	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, Nr. 632543
α -Rab5a, Maus	5% Milchpulver	1:500	BD, Franklin Lakes, USA, Nr. 610724
α -Rab7a, Maus	5% Milchpulver	1:2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Nr. R8779
α -Rab11a, Maus	5% Milchpulver	1:1000	BD, Franklin Lakes, USA, Nr. 610656
α -Akt, Maus	5% Milchpulver	1:1000	Cell Signaling, Boston, USA, Nr. 9272
α -Akt-ser-473, Kaninchen	5% Milchpulver	1:1000	Cell Signaling, Boston, USA, Nr. 4060
α -Akt-thr-308, Kaninchen	5% Milchpulver	1:1000	Cell Signaling, Boston, USA, Nr. 2918
α - β -Aktin, Kaninchen	5% Milchpulver	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Nr. A2066

Tabelle 2.5: Sekundärantikörper – für die Immundetektion

Sekundär-antikörper, Spezies	Blockierung in TBST	Verdünnung	Firma
α -Maus-800CW, Ziege	5% Milchpulver	1:10000	Li-cor, Lincoln, USA, Nr. 926-32210
α -Kaninchen-800CW, Ziege	5% Milchpulver	1:10000	Li-cor, Lincoln, USA, Nr. 926-32211

Bei der Immundetektion werden Proteine, die an einer Nitrocellulose-Membran gebunden sind, spezifisch detektiert. Grundlage der Methode ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Für die Immundetektion ist es essentiell, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Dafür wurde die Membran mindestens eine Stunde in Milchpulver (5% Milchpulver in TBST) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit 1*TBST wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Überschüssige Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen sind, wurden durch erneute Waschschriffe entfernt (dreimal zehn Minuten). Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und anschließend detektiert mit dem *infrared imaging system* LI-COR.

3 ERGEBNISSE

3.1 Lipid Rafts: Ihr Einfluss auf den durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch DRA

Im Ileum und im proximalen Kolon erfolgt die NaCl-Resorption durch parallelen Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch, der durch die Ionenaustauscher NHE3 und DRA vermittelt wird (Kato and Romero, 2011). NHE3 sowie DRA sind partiell in Lipid Rafts lokalisiert. Für NHE3 zeigte die Arbeitsgruppe um Marc Donowitz, dass dessen Raft-Assoziation die Funktion sowie das Trafficking von NHE3 beeinflusst (Murtazina et al., 2006). Eine Störung der Raft-Integrität führt zu einer Verminderung der Transportaktivität von NHE3, während eine Stimulation mit EGF den Anteil an NHE3 in Lipid Rafts erhöht und einen gesteigerten Na^+/H^+ -Austausch zur Folge hat (Li et al., 2001). In einer vorausgegangenen Diplomarbeit wurde gezeigt, dass auch DRA partiell in Lipid Rafts lokalisiert ist, und dass diese Raft-Assoziation unabhängig von dessen PDZ-Interaktionsmotiv ist. Neben DRA und NHE3 sind auch die PDZ-Adapterproteine NHERF2, NHERF3 und NHERF4 partiell in Rafts lokalisiert und interagieren dort mit DRA.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Raft-Assoziation von DRA essentiell für dessen Transportaktivität und Oberflächenexpression ist.

3.1.1 Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf den durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch in HEK-Zellen

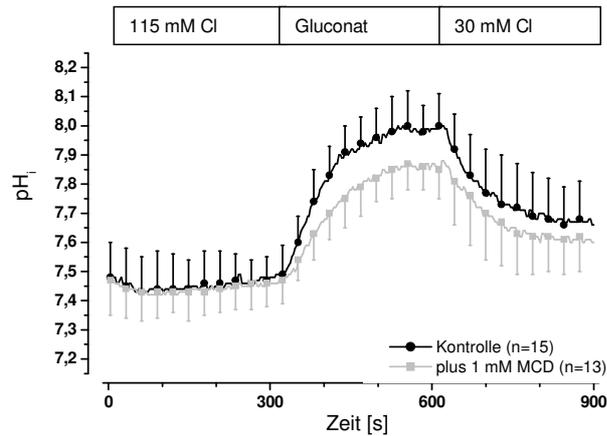
Dass Rafts sehr reich an Cholesterin sind, ist essentiell für die Raft-Integrität. Die Manipulation des Cholesteringehalts der Zelle ist demnach eine Möglichkeit, die Raft-Integrität zu stören (Shogomori and Brown, 2003). Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) ist ein zyklischer Glucoseoligomer, in dessen hydrophobem Kern lipophile Substanzen wie Cholesterin gebunden werden können. Sinkt die Cholesterinkonzentration in der Zelle und somit in den Rafts, wird deren Konsistenz fluider, und mit Rafts assoziierte Proteine diffundieren aus den Rafts. Um die Aktivität von DRA bzw. DRA-ETKFminus (Mutante, der das PDZ-Interaktionsmotiv fehlt) nach Störung der Raft-Integrität zu messen, wurden HEK-

Zellen, die stabil EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus exprimieren, mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF gefärbt und in eine Durchflussküvette des Fluormeters eingebaut. Die Zellen wurden zunächst mit einem Cl⁻-haltigen Puffer umspült (0-300 s), danach wurde auf einen Cl⁻-freien Puffer gewechselt (300-600 s) und schließlich wieder auf einen Cl⁻-haltigen Puffer (600-900 s) (siehe Kapitel 2.2.5). Der Wechsel bei 300 s auf den Cl⁻-freien Puffer hat eine Zunahme des intrazellulären pH-Wertes zur Folge, da Cl⁻ im Austausch gegen HCO₃⁻ die Zellen verlässt. Die daraus resultierende Anstiegssteilheit und das Ausmaß der Alkalinisierung sind ein Maß für die Transportaktivität von DRA. Die Messwerte wurden im Anschluss mit Hilfe von Microsoft Excel und Jmp 8 ausgewertet. Vor den funktionellen Untersuchungen wurden die Zellen mit 1 mM MCD für 60 min bei 37°C inkubiert, um die Raft-Integrität zu stören. Kontrollzellen wurden nicht mit MCD vorinkubiert.

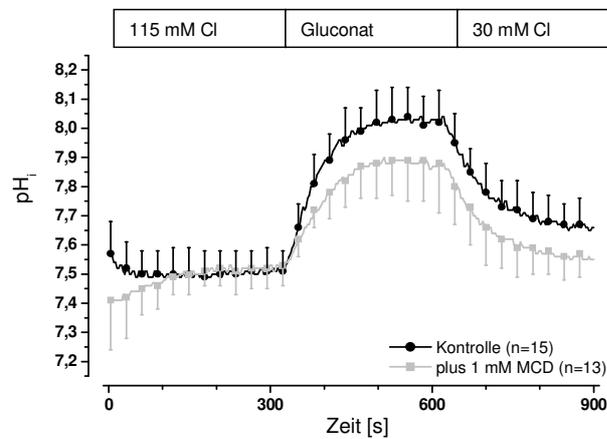
In einer EGFP-DRA „mixed“ Population von stabil transfizierten HEK Zellen führt eine Störung der Raft-Integrität durch MCD zu einer Inhibition des initialen pH_i-Anstieges um 38% und maximalen pH_i-Wertes um 16% (Abbildung 3.1 A: maximaler ΔpH_i $0,60 \pm 0,09$ vs $0,51 \pm 0,06$, -16%, $p < 0,05$; und der initiale Anstieg $0,47 \pm 0,15$ pH/min vs $0,29 \pm 0,10$, -38%, $p < 0,05$). Ein entsprechendes Ergebnis zeigt sich auch in klonal EGFP-DRA stabil exprimierenden HEK-Zellen. Der initiale pH_i-Anstieg sinkt hier um 39% und der maximale pH_i-Wert um 28%. (Abbildung 3.1 B: maximaler ΔpH_i $0,62 \pm 0,07$ vs $0,46 \pm 0,21$, -28%, $p < 0,05$; und der initiale Anstieg $0,61 \pm 0,16$ pH/min vs $0,37 \pm 0,15$, -39%, $p < 0,05$). In HEK-Zellen, die stabil EGFP-DRA-ETKFminus (Mutante, die nicht mit den PDZ-Adapterproteinen interagieren kann) exprimieren, führt die Störung der Raft-Integrität dagegen nicht zu einer Verminderung der Transportaktivität von DRA, es ist keine Abnahme des initialen sowie maximalen pH_i-Anstieges im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten (Abbildung 3.1 C: maximaler ΔpH_i $0,58 \pm 0,09$ vs $0,53 \pm 0,04$, -4%, $p > 0,05$; und der initiale Anstieg $0,47 \pm 0,18$ pH/min vs $0,50 \pm 0,16$, +5%, $p > 0,05$).

Ein Teil der Transportaktivität von DRA ist somit abhängig von dessen Raft-Assoziation und dieser Anteil ist wiederum abhängig von der Interaktion von DRA mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen.

A HEK/EGFP-DRA-mixed



B HEK/EGFP-DRA



C HEK/EGFP-DRA-ETKFminus

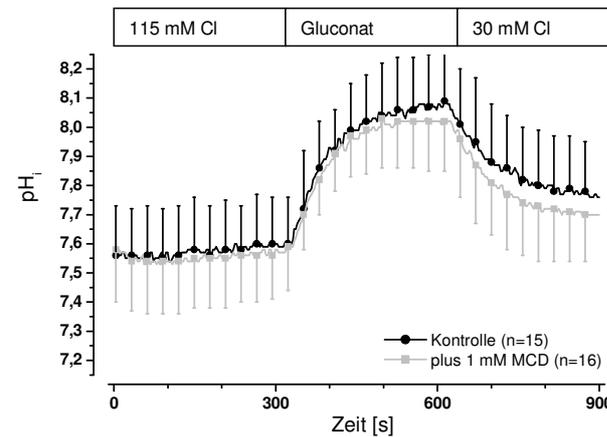


Abbildung 3.1: Reduktion der DRA-Aktivität durch Störung der Raft-Integrität in HEK-Zellen

Konfluente HEK/EGFP-DRA- (A und B) und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen (C) wurden zu funktionellen Untersuchungen herangezogen. Hierfür wurden die Zellen mit BCECF angefärbt und die Aktivität mit dem Fluorometer erfasst. Zur Cholesterindepletion wurden die Zellen mit 1 mM MCD für 60 min bei 37°C inkubiert (graue Kurven). Kontrollzellen wurden nicht mit MCD inkubiert (schwarze Kurven). A: Reduktion der DRA-Aktivität in einer HEK/EGFP-DRA „mixed“ Population. B: Reduktion der DRA-Aktivität in klonal EGFP-DRA stabil exprimierenden HEK-Zellen. C: Keine Reduktion der DRA-Aktivität in klonalen HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen.

3.1.2 Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf den durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch in Caco-2/BBE-Zellen

Der Effekt der Störung der Raft-Integrität durch MCD auf den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch wurde zusätzlich untersucht in differenzierten Darmepithelzellen, den Caco-2/BBE-Zellen. Diese Zelllinie zeigt für das Darmepithel typische Eigenschaften wie polare Differenzierung, Ausbildung einer hochprismatischen Zellgestalt sowie Tight Junctions, Desmosomen und Mikrovilli. Zehn Tage vor Versuchsbeginn wurde den Caco-2/BBE/EGFP-DRA- und Caco-2/BBE/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen Doxycyclin entzogen, um die EGFP-DRA- bzw. EGFP-DRA-ETKFminus-Expression zu starten (siehe Kapitel 2.2.1.3). Zur Aktivitätsmessung wurden die Zellen wiederum mit BCECF angefärbt und die Aktivität als Alkalinisierung nach Entzug von extrazellulärem Chlorid und Reazidifizierung nach Wiedergabe von extrazellulärem Chlorid gemessen (siehe Kapitel 2.2.5). Vor diesen funktionellen Untersuchungen wurden die Zellen zur Cholesterindepletion und somit Störung der Raft-Integrität mit 20 mM MCD inkubiert (60 min; 37°C). Die Kontrollzellen wurden nicht mit MCD vorinkubiert.

In EGFP-DRA exprimierenden Caco-2/BBE-Zellen führt die Störung der Raft-Integrität zu einer Verminderung der Transportaktivität. Die maximale pH_i -Wert-Änderung war um 32% nach Entzug von extrazellulärem Chlorid reduziert (Abbildung 3.2 A: maximaler ΔpH_i $0,42 \pm 0,09$ vs $0,28 \pm 0,08$, $p < 0,05$) und der initiale pH_i -Anstieg um 37% ($0,27 \pm 0,13$ pH/min vs $0,17 \pm 0,08$, $p < 0,05$). Die Aktivität von EGFP-DRA-ETKFminus war ebenfalls nach Inkubation mit MCD in Caco-2/BBE-Zellen reduziert (Abbildung 3.2 B: maximaler ΔpH_i $0,50 \pm 0,07$ vs $0,41 \pm 0,09$, -17%, $p < 0,05$; initial slope $0,45 \pm 0,09$ pH/min vs $0,39 \pm 0,10$, -13%, aber $p > 0,05$). Im Vergleich zur Inhibition von Wildtyp-DRA war die Inhibition von EGFP-DRA-ETKFminus jedoch geringer ausgeprägt. Die Inkubation mit MCD führte in beiden stabil transfizierten Zelllinien zu einer Herabsetzung des *base-line*- pH_i . Deshalb wurde die Änderung des *base-line*- pH_i nach Inkubation mit MCD auch in untransfizierten Caco-2/BBE-Zellen gemessen. Auch hier führte die MCD-Inkubation zu einer Herabsetzung des pH_i -Wertes (Abbildung 3.2 C). Dieser Effekt war zwischen den drei Zelllinien statistisch nicht unterschiedlich ($p > 0,05$). Das heißt, der Effekt von MCD auf den *base-line*- pH_i ist unabhängig von DRA. Die Störung der Raft-Integrität führt zu einer stärkeren Hemmung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches vermittelt durch Wildtyp-DRA als durch DRA-ETKFminus in Caco-2/BBE Zellen. Dies deutet darauf hin, dass in intestinalen Epithelzellen die Transportaktivität von DRA teilweise abhängig ist von dessen Raft-Assoziation. Diese von Rafts abhängige Transportaktivität hat wahrscheinlich zwei Komponenten – die eine ist von PDZ-Adapterproteinen abhängig, die andere davon unabhängig.

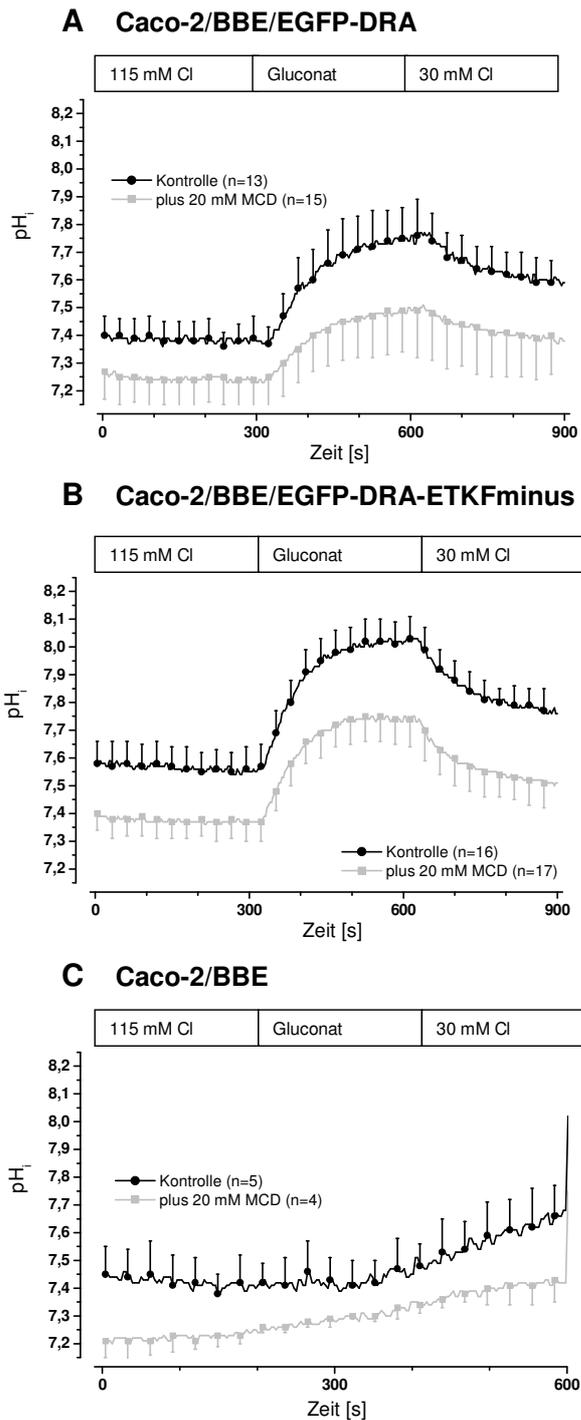


Abbildung 3.2: Reduktion der DRA-Aktivität durch Störung der Raft-Integrität in Caco-2/BBE-Zellen

Die DRA-Aktivität wurde in konfluenten Caco-2/BBE/EGFP-DRA- (A), Caco-2/BBE/EGFP-DRA-ETKFminus- (B) und Caco-2/BBE-Zellen (C) mittels Fluorometrie gemessen. Die Zellen wurden mit BCECF angefärbt und die Aktivität als Alkalinisierung nach Entzug von extrazellulärem Chlorid und Reacidifizierung nach Wiedergabe von extrazellulärem Chlorid gemessen. Zur Cholesterindepletion wurden die Zellen mit 10 mM MCD für 60 min bei 37°C inkubiert (graue Kurven). Kontrollzellen wurden nicht mit MCD inkubiert (schwarze Kurven). A: Reduktion der DRA-Aktivität. B: Reduktion der DRA-ETKFminus-Aktivität. C: Cholesterindepletion führt zu einer Herabsetzung des *base-line*-pH_i in Caco-2/BBE-Zellen.

3.1.3 Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf die Oberflächenexpression von DRA in HEK-Zellen

Die aus der Störung der Raft-Integrität resultierende Inhibition des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches könnte im Zusammenhang stehen mit einer verminderten Oberflächenexpression von DRA nach Reduktion des Cholesteringehaltes der Zelle. Die Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus nach Störung der Raft-Integrität wurde in stabil transfizierten HEK-Zellen untersucht. Die an der Plasmamembran exprimierte EGFP-DRA- und EGFP-DRA-ETKFminus-Moleküle wurden mittels NHS-SS-Biotin markiert, mittels Streptavidin-gekoppelter Agarose isoliert und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen EGFP detektiert. Nach Quantifizierung der Bandenintensität von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde die relative Veränderung der Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität des biotinylierten EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus zu der Bandenintensität des gesamten EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus im Lysat. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen die Wiederauffindungsrate von biotinylierten DRA plus nicht biotinylierten DRA zum Gesamt-DRA zwischen 85 und 115% lag.

Inkubiert man die Membran mit einem EGFP-spezifischen Antikörper, erscheint eine Doppelbande bei 180 kDa und 145 kDa, bei der es sich um EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus handelt (Abbildung 3.3). In Kontrollzellen (HEK/EGFP-DRA) wurde $21,7 \pm 4,8\%$ des exprimierten DRAs an der Zelloberfläche detektiert. Nach Störung der Raft-Integrität durch Inkubation mit MCD (1 mM; 60 min; 37°C) wurden nur noch $16,1 \pm 4,8\%$ des exprimierten EGFP-DRAs an der Plasmamembran detektiert. Das heißt, eine Störung der Raft-Integrität führt zu einer Verminderung der Oberflächenexpression von EGFP-DRA um 25% ($p < 0,05$) (Abbildung 3.3 A). In HEK-Zellen, die EGFP-DRA-ETKFminus exprimieren, in denen keine PDZ-Interaktion möglich ist, hat die Störung der Raft-Integrität keine Verminderung der Oberflächenexpression von EGFP-DRA-ETKFminus zur Folge. In Kontrollzellen (HEK/EGFP-DRA-ETKFminus) wurden $24,2 \pm 3,2\%$ des exprimierten DRA-ETKFminus an der Plasmamembran detektiert und nach Störung der Raft-Integrität waren es $23,3 \pm 5\%$ ($p > 0,05$) (Abbildung 3.3 B).

Die Störung der Raft-Integrität führt zu einer verminderten Oberflächenexpression von DRA, nicht aber von DRA-ETKFminus. Dies legt nahe, dass die Raft-Lokalisation, die Oberflächenexpression und die PDZ-Interaktion von DRA funktionell aneinander gekoppelt sind.

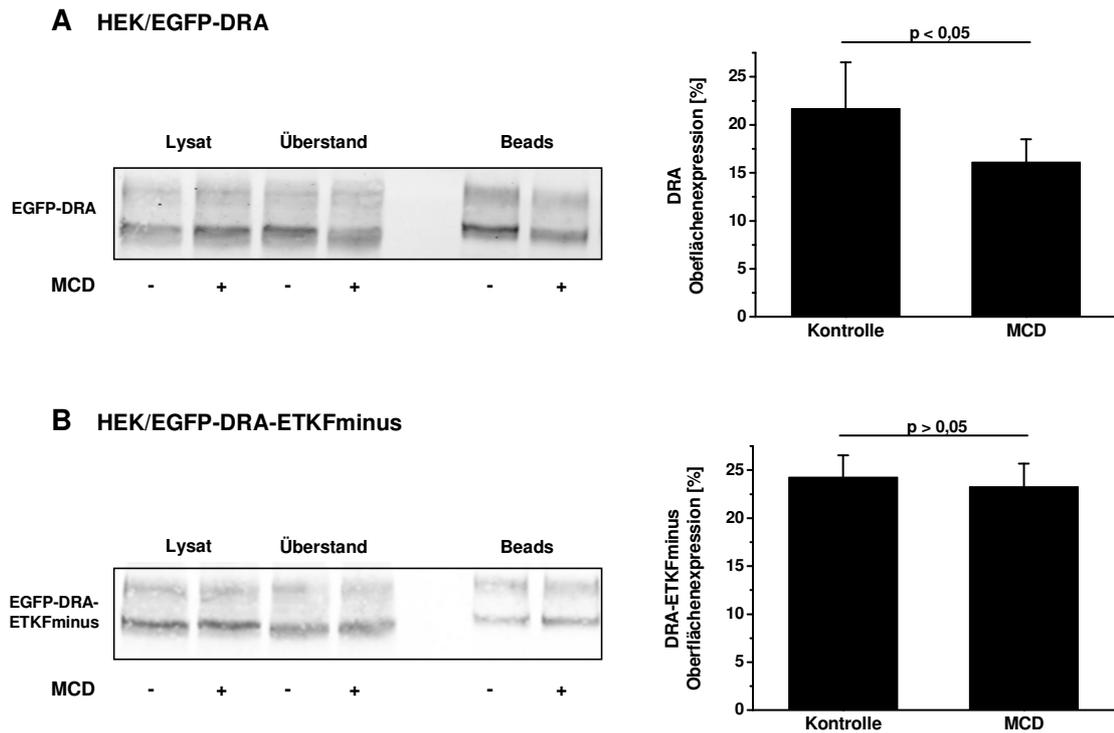


Abbildung 3.3: Verminderung der Oberflächenexpression von DRA nach Störung der Raft-Integrität in HEK-Zellen

Um die Oberflächenexpression von EGFP-DRA (A) und EGFP-DRA-ETKFminus (B) zu bestimmen, wurden die an der Plasmamembran exprimierten Proteine markiert mittels NHS-SS-Biotin, isoliert durch Streptavidin-gekoppelte Agarose und analysiert mittels SDS-PAGE und Western Blot. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden detektiert mit einem spezifischen Anti-EGFP-Antikörper und fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper. Nach Störung der Raft-Integrität durch MCD nimmt die Oberflächenexpression von DRA um 25% ab ($p < 0,05$), nicht aber von DRA-ETKFminus. Anzahl der Experimente $n = 4$.

3.2 PI3-kinase: Ihr Einfluss auf den durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch

Die Störung der Raft-Integrität führt in HEK-Zellen zu einem verminderten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch sowie zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von DRA in Abhängigkeit von der Interaktion von DRA mit PDZ-Adapterproteinen. In Caco-2/BBE-Zellen führt die Störung der Raft-Integrität zu einer stärkeren Inhibition des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches vermittelt durch Wildtyp-DRA als durch DRA-ETKFminus. Nach diesen derzeitigen Ergebnissen könnten Lipid Rafts eine Rolle spielen für die Insertion von DRA in die Plasmamembran. Eine Störung der Raft-Integrität hätte einen verminderten Einbau von DRA in die Plasmamembran zur Folge und somit eine Reduktion der Oberflächenexpression und Transportaktivität. Des Weiteren könnte aber auch die Raft-

Assoziation die Retentionszeit von DRA in der Plasmamembran beeinflussen. Eine Störung der Raft-Integrität würde in diesem Falle die Endozytose von DRA begünstigen und dies hätte wiederum eine verminderte Oberflächenexpression und Transportaktivität zur Folge. Die basale Exozytose von NHE3 erfolgt abhängig von der PI3-Kinase und Lipid Raft (Murtazina et al., 2006). Des Weiteren stimuliert das Probiotikum *Lactobacillus acidophilus* den DRA-vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch in Abhängigkeit von der PI3-Kinase (Borthakur et al., 2008). Diese Befunde geben Hinweise darauf, dass möglicherweise der Einbau von DRA in die Plasmamembran auch abhängig von der PI3-Kinase und den Rafts erfolgt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Transportaktivität und die Oberflächenexpression von DRA abhängig von der Aktivität der PI3-Kinase sind und welche Rolle hierbei die PDZ-Interaktion spielt.

3.2.1 Inhibition der PI3-Kinase: Einfluss auf den durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch in HEK-Zellen

LY294002 ist ein synthetisch hergestellter Inhibitor der PI3-Kinase. LY294002 bindet an die aktive Seite der katalytischen p110-Untereinheit der PI3-Kinase und hemmt damit die Kinaseaktivität (Vlahos et al., 1994). Um den Einfluss der PI3-Kinase auf die Transportaktivität von DRA zu untersuchen, wurden HEK-Zellen, die stabil EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus exprimieren, vor den funktionellen Untersuchungen mit LY294002 (50 μM ; 30 min; 37°C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit BCECF angefärbt und die Aktivität als Alkalinisierung nach Entzug von extrazellulärem Chlorid und Reazidifizierung nach Wiederingabe von extrazellulärem Chlorid gemessen (siehe Kapitel 2.2.5).

Abbildung 3.4 A zeigt, dass eine Inhibition der PI3-Kinase zu einem verminderten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt durch EGFP-DRA führt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (keine Inkubation mit LY294002) nimmt der maximale pH_i -Wert um 19% ab (maximaler ΔpH_i $0,56 \pm 0,06$ vs $0,45 \pm 0,04$, -19%, $p < 0,05$; und initiale Anstieg $0,52 \pm 0,16$ pH/min vs $0,44 \pm 0,07$, -15%, $p > 0,05$). Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der PI3-Kinase nicht zu einer Verminderung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches vermittelt durch EGFP-DRA-ETKFminus (Abbildung 3.4 B: maximaler ΔpH_i $0,56 \pm 0,07$ vs $0,57 \pm 0,07$, +2%, $p > 0,05$; und der initiale Anstieg $0,89 \pm 0,19$ pH/min vs $0,86 \pm 0,17$, -3%, $p > 0,05$).

Die Transportaktivität von Wildtyp-DRA, nicht jedoch von DRA-ETKFminus, ist somit abhängig von der PI3-Kinase.

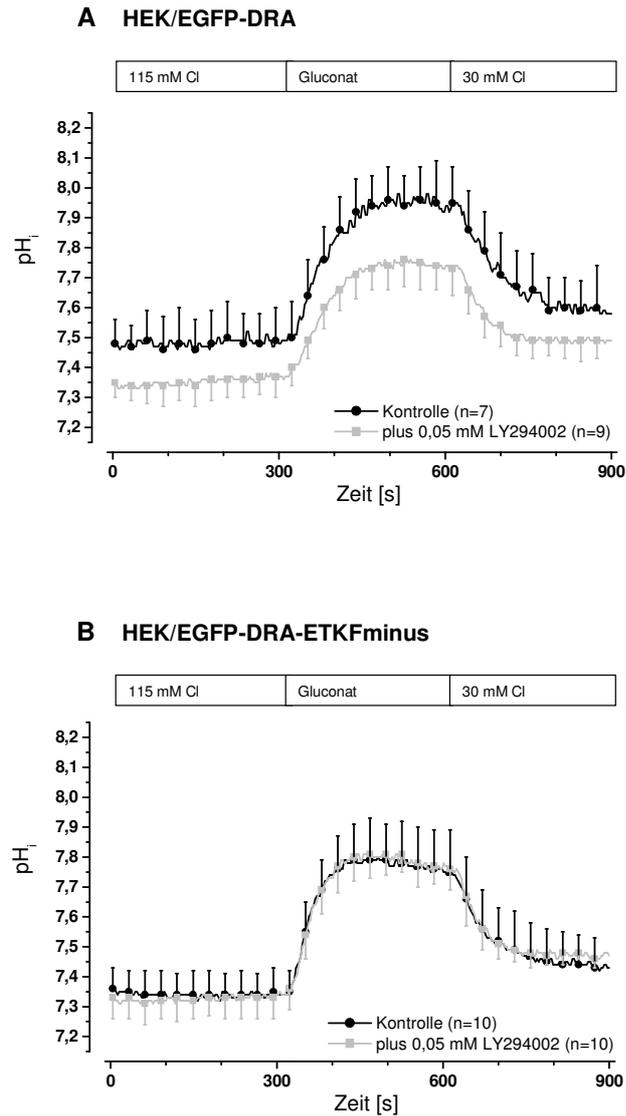


Abbildung 3.4: Reduktion der DRA-Aktivität durch Inhibition der PI3-Kinase in HEK-Zellen

Zur Inhibition der PI3-Kinase wurden HEK/EGFP-DRA- (A) und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus- (B) Zellen mit 50 μ M LY294002 inkubiert (30 min; 37 °C) (graue Kurven). Anschließend wurde die DRA-Aktivität gemessen mittels Fluorometrie. Kontrollzellen wurden nicht mit MCD inkubiert (schwarze Kurven). A: Reduktion des Cl⁻/HCO₃⁻-Austausches vermittelt durch DRA nach Inhibition der PI3-Kinase. B: Keine Inhibition der DRA-ETKFminus-Aktivität nach LY294002-Inkubation.

Um sicherzustellen, dass LY294002 die PI3-Kinase in ihrer Aktivität hemmt, wurde der Phosphorylierungsstatus von Akt (einem Effektorprotein der PI3-Kinase) untersucht. Akt befindet sich in einem aktiven Zustand, sobald die Phosphorylierungsstellen Threonin-308 und Serin-473 phosphoryliert vorliegen. Einige für die Funktionsmessungen vorbereitete Zellen wurden lysiert. Diese Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion analysiert. Akt, Akt-ser-P-473 und Akt-thr-P-308 wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Inkubiert man die Membran mit den verschiedenen Akt-Antikörpern,

erscheint eine Bande bei 60 kDa. Eine Inkubation der Zellen mit LY294002 und somit Inhibition der PI3-Kinase führt zu einem Verschwinden der Phosphorylierungen der Aminosäuren Serin-473 und Threonin-308 im Akt-Molekül und somit zu einem Verschwinden der Banden bei 60 kDa (Abbildung 3.5). Das heißt, die PI3-Kinase wurde effektiv durch die Inkubation mit LY294002 gehemmt.

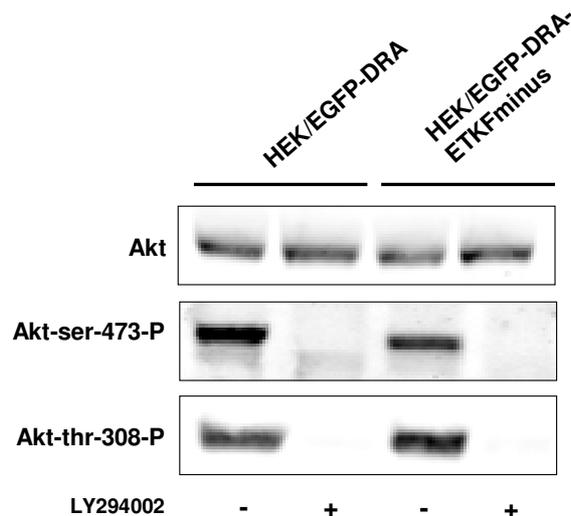


Abbildung 3.5: Inhibition der PI3-Kinase; keine Phosphorylierung von Akt

Zur Inhibition der PI3-Kinase wurden HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen mit 50 μ M LY294002 inkubiert (30 min; 37 °C) und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Akt, Akt-ser-P-473 und Akt-thr-P-308 wurden mit spezifischen Antikörpern (Anti-Akt, Anti-Akt-ser-P-473, Anti-Akt-thr-P-308) und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern detektiert. Nach Inhibition der PI3-Kinase liegen die Aminosäuren Serin-473 und Threonin-308 im Akt-Molekül nicht mehr phosphoryliert vor. Anzahl der Experimente n = 3.

3.2.2 Inhibition der PI3-Kinase: Einfluss auf die Oberflächenexpression von DRA in HEK-Zellen

Die verminderte Transportaktivität von DRA nach Inhibition der PI3-Kinase könnte die Folge einer verminderten Oberflächenexpression von DRA sein. Die Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde in stabil transfizierten HEK Zellen untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit 50 μ M LY294002 (30 min; 37 °C) wurden die an der Plasmamembran exprimierten EGFP-DRA- und EGFP-DRA-ETKFminus-Moleküle mittels NHS-SS-Biotin markiert, mittels Streptavidin-gekoppelter Agarose isoliert und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen EGFP detektiert. Nach Quantifizierung der Bandenintensität von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde die relative Veränderung der Oberflächenexpression von

EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität des biotinylierten EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus zu der Bandenintensität des gesamten EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus im Lysat. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen die Wiederauffindungsrate von biotinylierten DRA plus nicht biotinylierten DRA zum Gesamt-DRA zwischen 85 und 115% lag.

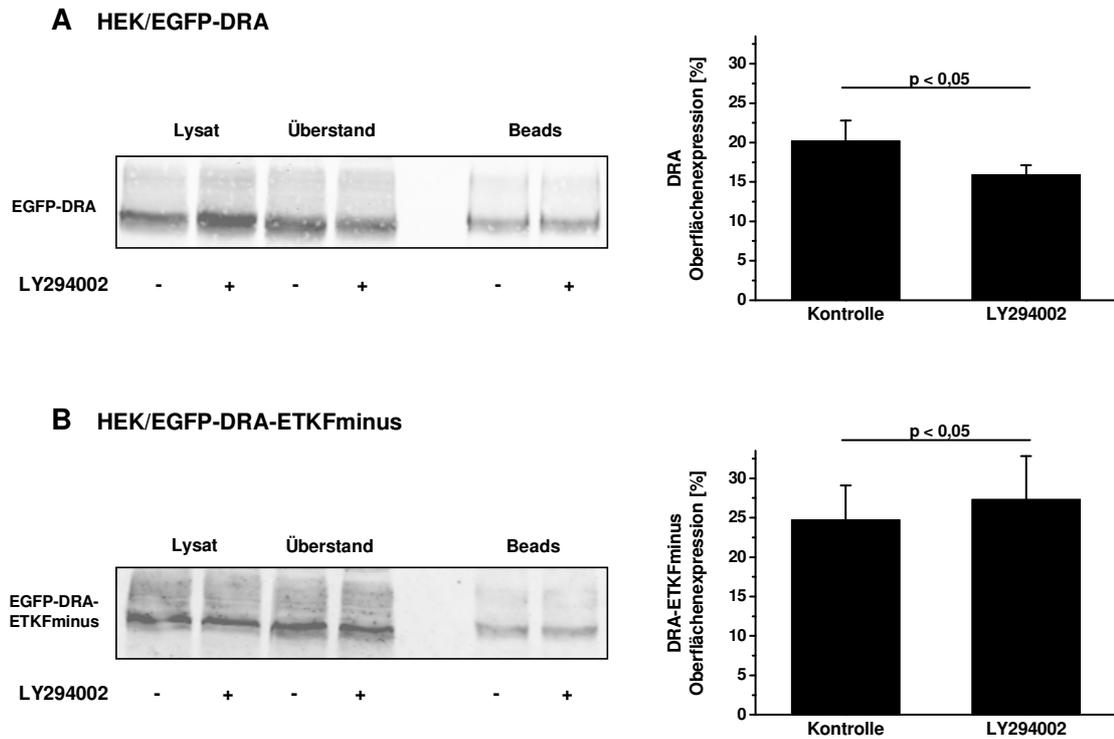


Abbildung 3.6: Reduktion der Oberflächenexpression von DRA nach Inhibition der PI3-Kinase in HEK-Zellen

Um die Oberflächenexpression von EGFP-DRA (A) und EGFP-DRA-ETKFminus (B) zu bestimmen, wurden die an der Plasmamembran exprimierten Proteine markiert mittels NHS-SS-Biotin, isoliert durch Streptavidin-gekoppelte Agarose und analysiert mittels SDS-PAGE und Western Blot. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden detektiert mit einem spezifischen Anti-EGFP-Antikörper und fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper. Nach Inhibition der PI3-Kinase durch Inkubation der Zellen mit LY294002 nimmt die Oberflächenexpression von DRA um 21% ab ($p < 0,05$), nicht aber von DRA-ETKFminus. Anzahl der Experimente $n = 4$.

Abbildung 3.6 A zeigt, dass in Kontrollzellen (HEK/EGFP-DRA) $20,2 \pm 2,6\%$ des exprimierten DRAs an der Zelloberfläche detektiert wurde. Nach Inhibition der PI3-Kinase wurden nur noch $15,9 \pm 1,2\%$ des exprimierten DRAs an der Plasmamembran detektiert. Eine Inhibition der PI3-Kinase führt folglich zu einer Verminderung der Oberflächenexpression von DRA um 21% ($p < 0,05$). In HEK-Zellen, die DRA-ETKFminus exprimieren (keine PDZ-Interaktion möglich), führt die Inhibition der PI3-Kinase zu keiner Verminderung der Oberflächenexpression von EGFP-DRA-ETKFminus. In Kontrollzellen

(HEK/EGFP-DRA-ETKFminus) wurden $24,7 \pm 4,4\%$ des exprimierten DRAs an der Plasmamembran und nach Inkubation mit LY294002 $27,3 \pm 5,4\%$ detektiert ($p > 0,05$) (Abbildung 3.6 B).

Die Inhibition der PI3-Kinase führt zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von DRA, nicht aber von DRA-ETKFminus.

3.3 Lipid Rafts und PI3-Kinase: Beeinflussung des gleichen Trafficking-Pfades von DRA

Für NHE3 wurde gezeigt, dass dessen Insertion in die Plasmamembran abhängig von seiner partiellen Raft-Assoziation und der PI3-Kinase ist (Murtazina et al., 2006). Eine Inhibition der PI3-Kinase führt zu einer Reduktion des Na^+/H^+ -Austausches, zu einer Verminderung der Oberflächenexpression von NHE3 und zu einer Akkumulation von NHE3 in intrazellulären Kompartimenten (Kurashima et al., 1998). Eine gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und Störung der Raft-Integrität führt zu einer nicht additiven Inhibition des Na^+/H^+ -Austausches (Murtazina et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass Lipid Rafts und die PI3-Kinase den gleichen Trafficking-Pfad von NHE3 beeinflussen (Murtazina et al., 2006). Die Oberflächenexpression sowie die Transportaktivität von DRA sind abhängig von dessen partieller Raft-Assoziation und werden beeinflusst durch die Aktivität der PI3-Kinase. Eine Störung der Raft-Integrität sowie eine Hemmung der PI3-Kinase führt zu einem verminderten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch und zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von DRA.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Lipid Rafts und die PI3-Kinase den gleichen Trafficking-Pfad von DRA beeinflussen.

3.3.1 Gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf den durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch in HEK-Zellen

Um zu untersuchen, ob Lipid Rafts und die PI3-Kinase den gleichen Trafficking-Pfad von DRA beeinflussen, wurde die Transportaktivität von DRA nach gleichzeitiger Inkubation mit MCD (Störung der Raft-Integrität) und LY294002 (Inhibition der PI3-Kinase) gemessen. HEK-Zellen, die stabil EGFP-DRA exprimieren, wurden gleichzeitig inkubiert mit 1 mM MCD (60 min) und 50 μM LY294002 (30 min) bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen gefärbt mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF. Nach dem Einbau in eine Durchflussküvette eines Fluormeters wurden die Zellen nacheinander mit einem Cl^- -haltigen Puffer (0-300 s),

mit einem Cl⁻-freien Puffer (300-600 s) und schließlich wieder mit einem Cl⁻-haltigen Puffer (600-900 s) umspült (siehe Kapitel 2.2.5). Die Aktivität wurde als Alkalinisierung nach Entzug von extrazellulärem Chlorid und Reacidifizierung nach Wiedergabe von extrazellulärem Chlorid gemessen. Die Kontrollzellen wurden nur mit MCD bzw. weder mit MCD noch mit LY294002 inkubiert.

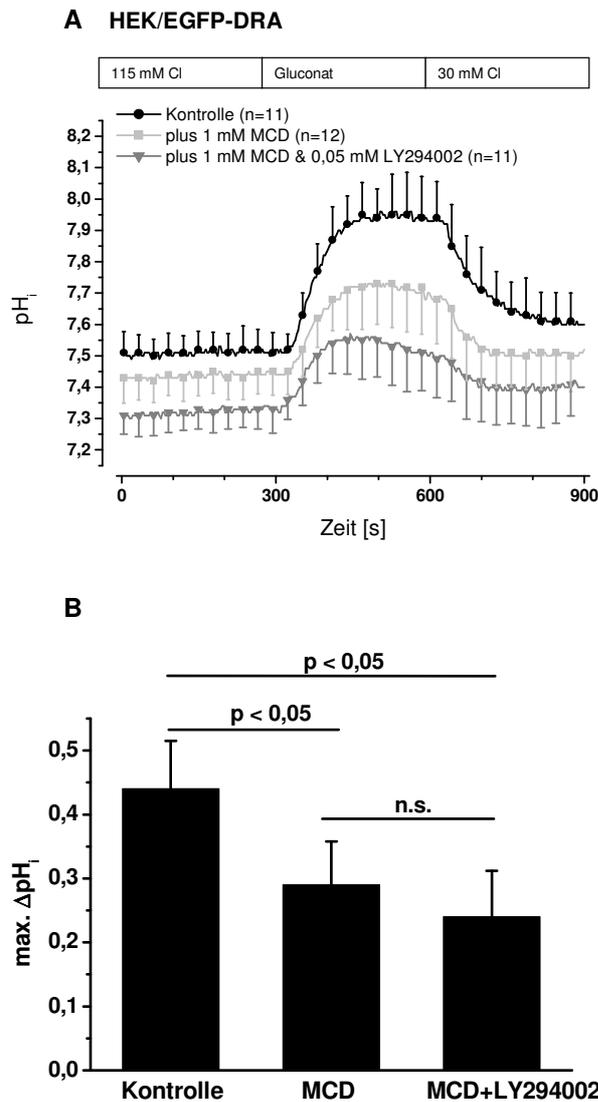


Abbildung 3.7: Nicht additive Reduktion der DRA-Aktivität durch gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und Störung der Raft-Integrität in HEK-Zellen

HEK/EGFP-DRA-Zellen wurden gleichzeitig inkubiert mit MCD (1 mM; 60 min; 37°C) und LY294002 (50 μM; 30 min; 37°C) und anschließend zur Aktivitätsmessung mittels Fluorometrie herangezogen. A: Eine gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und Störung der Raft-Integrität inhibiert die DRA-Aktivität nicht stärker als eine alleinige Inkubation mit MCD (Störung der Raft-Integrität). B: Zusammenfassung der maximalen pH_i-Wertänderung.

Abbildung 3.7 zeigt, dass eine Störung der Raft-Integrität durch Inkubation mit MCD zu einer Reduktion der Transportaktivität um 34% führt (maximaler ΔpH_i $0,44 \pm 0,07$ vs $0,29 \pm 0,07$, $p < 0,05$; und der initiale Anstieg $0,45 \pm 0,10$ pH/min vs $0,34 \pm 0,12$, -25%, $p > 0,05$). Die gleichzeitige Störung der Raft-Integrität und Inhibition der PI3-Kinase führt zu keiner weiteren Reduktion des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches (maximaler ΔpH_i $0,24 \pm 0,07$, -45% verglichen mit den Kontrollzellen ohne MCD-Inkubation, $p < 0,05$; jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen mit MCD-Inkubation; und der initiale Anstieg $0,37 \pm 0,16$ pH/min, -18%, $p > 0,05$).

Diese nicht additive Hemmung der DRA-Aktivität führt zu der Annahme, dass Lipid Rafts und die PI3-Kinase denselben Trafficking-Pfad von DRA beeinflussen.

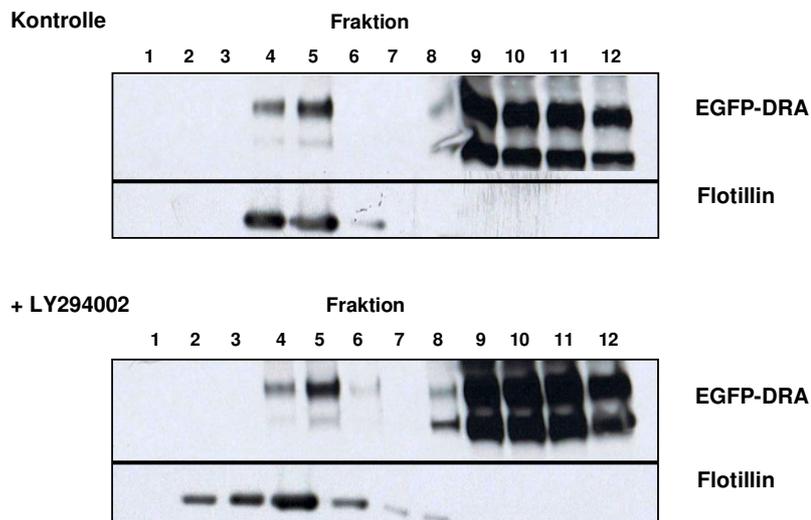
3.3.2 Inhibition der PI3-Kinase: Einfluss auf die Raft-Assoziation von DRA in HEK-Zellen

Um auszuschließen, dass die Inhibition der PI3-Kinase die Raft-Assoziation von DRA beeinflusst, wurden HEK-Zellen, die stabil EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus exprimieren, mit LY294002 inkubiert und anschließend wurden Lipid Rafts präpariert (Brown and Rose, 1992). Konfluente stabil transfizierte HEK/EGFP-DRA- bzw. HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen wurden inkubiert mit 50 μM LY294002 (30 min, 37°C) und lysiert in Anwesenheit des nicht ionischen Detergens Triton-X100 (TX100) bei 4°C. Das Lysat wurde homogenisiert und überschichtet mit einem diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten. Nach Ultrazentrifugation wurden 1-ml-Fraktionen von oben (Fraktion1, niedrige Dichte) nach unten (Fraktion12, hohe Dichte) abgenommen, TCA-präzipitiert und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Flotillin mit einem Flotillin-spezifischen monoklonalen Antikörper. Lipid Rafts und Flotillin flottieren im Sucrose-Gradienten in dieselbe Fraktion mit niedriger Dichte und können nicht voneinander getrennt werden. Flotillin kann daher als Lipid-Raft-Marker genutzt werden (Rajendran et al., 2007; Salzer and Prohaska, 2001).

In allen Experimenten wurde Flotillin (48 kDa) vornehmlich in den Fraktionen niedriger Dichte detektiert. Das intensivste Flotillin-Signal war in den Fraktionen 4 und 5 an der Grenze zwischen 5% und 30% Sucrose nachzuweisen. Detergenzien-resistente Membranen flottieren in diese Fraktionen niedriger Dichte, während die meisten zellulären Proteine durch das Detergenz gelöst werden und in Fraktionen höherer Dichte zu detektieren sind. EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurden in den Fraktionen hoher sowie in den Fraktionen niedriger Dichte detektiert, wobei der größere Anteil an EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus in den Fraktionen höherer Dichte nachzuweisen war.

Somit ist DRA unabhängig von seinem PDZ-Interaktionsmotiv partiell in Rafts lokalisiert. Eine Inhibition der PI3-Kinase (Inkubation mit LY294002) hat keinen Einfluss auf das Flotationsmuster von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus. Beide Proteine konnten in den Fraktionen hoher sowie niedriger Dichte detektiert werden. Die partielle Raft-Assoziation von DRA ist demnach unabhängig von der Aktivität der PI3-Kinase.

A HEK/EGFP-DRA TX100 1%



B HEK/EGFP-DRA-ETKFminus TX100 1%

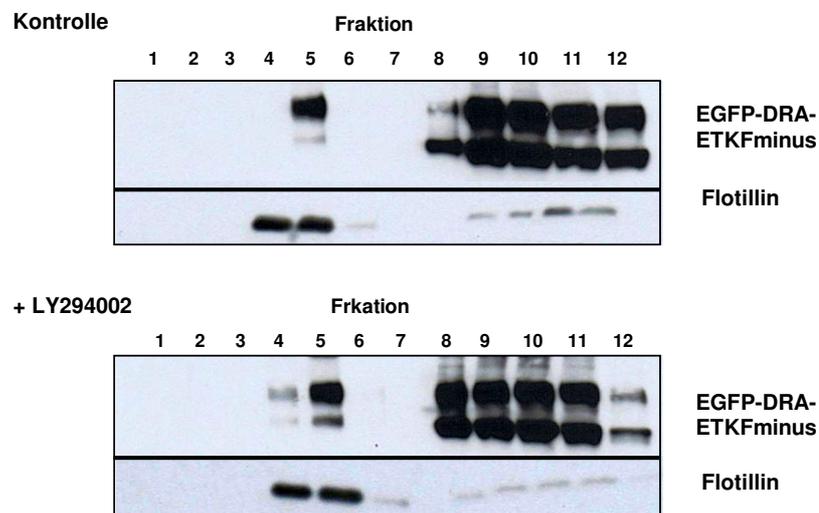


Abbildung 3.8: Eine Inhibition der PI3-Kinase hat keinen Einfluss auf die Raft-Assoziation von DRA in HEK-Zellen

Zur Inhibition der PI3-Kinase wurden HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen mit 50 μ M LY294002 inkubiert (30 min; 37°C) und anschließend zur Lipid Raft Fraktionierung (Brown and Rose, 1992) herangezogen unter Verwendung von 1% TX100. Im Anschluss wurden die Proteine TCA-präzipitiert und mittels SDS-PAGE analysiert und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus und Flotillin wurden detektiert mit spezifischen Antikörpern (Anti-EGFP, Anti-Flotillin) und fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörpern. A und B: LY294002 hat keinen Einfluss auf das Flotationsmuster von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und Flotillin. Anzahl der Experimente n = 3.

3.3.3 Störung der Raft-Integrität: Einfluss auf die Aktivität der PI3-Kinase in HEK-Zellen

Um sicherzustellen, dass Lipid Rafts und die PI3-Kinase den gleichen Trafficking-Pfad von DRA beeinflussen, musste ferner geklärt werden, ob eine Cholesterindepletion durch MCD eine Inhibition der PI3-Kinase zur Folge hat. Um dies auszuschließen, wurden HEK/EGFP-DRA und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen inkubiert mit 1 mM MCD für 60 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Phosphorylierungsstatus von Akt, ein Zielprotein der PI3-Kinase, mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion untersucht. Akt wurde durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper und Akt-ser-P-473 sowie Akt-thr-P-308 durch spezifische polyklonale Antikörper detektiert. Die Kontrollzellen wurden nicht mit MCD inkubiert.

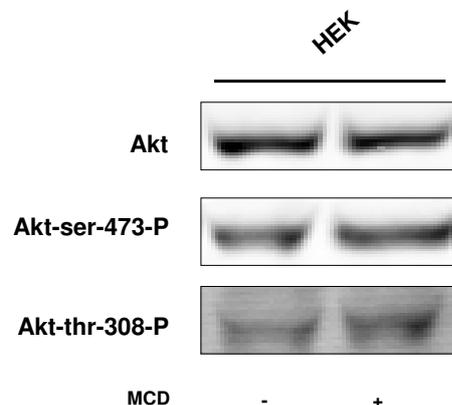


Abbildung 3.9: Keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Akt durch Störung der Raft-Integrität in HEK-Zellen

Zur Störung der Raft-Integrität wurden HEK-Zellen mit 1 mM MCD inkubiert (60 min; 37°C) und anschließend lysiert. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Akt, Akt-ser-P-473 und Akt-thr-P-308 wurden detektiert mit spezifischen Antikörpern (Anti-Akt, Anti-Akt-ser-P-473, Anti-Akt-thr-P-308) und fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern. Eine Störung der Raft-Integrität hat keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Akt. Kontrollzellen wurden nicht mit MCD inkubiert. Anzahl der Experimente n = 3.

Eine Inkubation mit MCD und somit die Cholesterindepletion der Zelle führt zu keiner Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Akt. Mit MCD-Inkubation sowie ohne MCD-Inkubation sind die Phosphorylierungsstellen Serin-473 und Threonin-308 phosphoryliert und es kann eine Bande bei 60 kDa detektiert werden (Abbildung 3.9). Eine Störung der Raft-Integrität hat keinen Einfluss auf die Aktivität der PI3-Kinase. Des Weiteren hat eine Inhibition der PI3-Kinase keinen Einfluss auf die Raft-Assoziation von DRA (siehe Kapitel

3.3.2). Diese beiden Ergebnisse bestärken die Annahme, dass Lipid Rafts und die PI3-Kinase den gleichen Trafficking-Pfad von DRA beeinflussen.

3.4 Das PDZ-Interaktionsmotiv: Einfluss auf die Oberflächenexpression und Degradation von DRA

In einem weiteren Oberflächenbiotinylierungsexperiment sollte geklärt werden, ob DRA und DRA-ETKFminus unterschiedlich stark in der Plasmamembran exprimiert werden. Es sollte die Frage beantwortet werden, welche Rolle das PDZ-Interaktionsmotiv für die Expression von DRA an der Plasmamembran spielt. Die Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde in stabil transfizierten HEK-Zellen untersucht. Die an der Plasmamembran exprimierten EGFP-DRA- und EGFP-DRA-ETKFminus-Moleküle wurden mittels NHS-SS-Biotin markiert, mittels Streptavidin-gekoppelter Agarose isoliert und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen EGFP detektiert. Nach Quantifizierung der Bandenintensität von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde die relative Veränderung der Oberflächenexpression von DRA und DRA-ETKFminus ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität des biotinylierten DRA und DRA-ETKFminus zu der Bandenintensität des gesamten DRA und DRA-ETKFminus im Lysat. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen die Wiederauffindungsrate von biotinylierten DRA plus nicht biotinylierten DRA zum Gesamt-DRA zwischen 85 und 115% lag.

In HEK/EGFP-DRA-Zellen wurden $23 \pm 7\%$ des exprimierten DRA an der Zelloberfläche detektiert. In HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen wurden $24 \pm 3\%$ des exprimierten DRA-ETKFminus an der Plasmamembran detektiert. Abbildung 3.10 zeigt somit, dass Wildtyp-DRA und DRA-ETKFminus zu gleichen Anteilen in der Plasmamembran exprimiert werden.

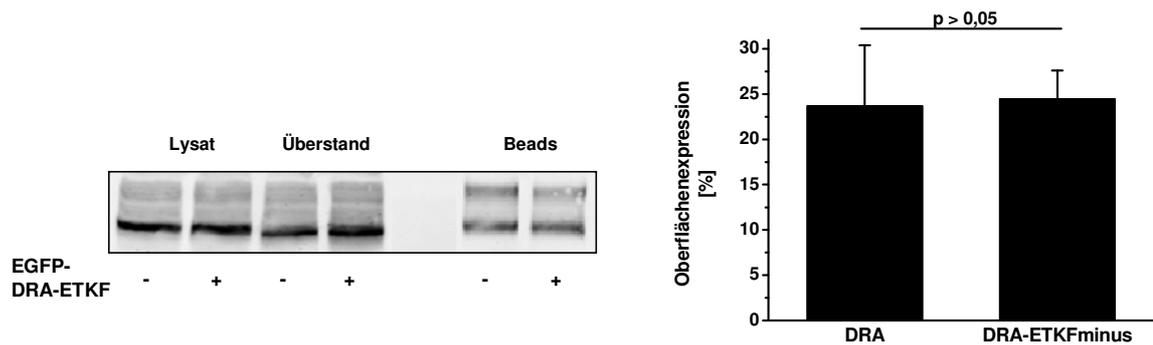
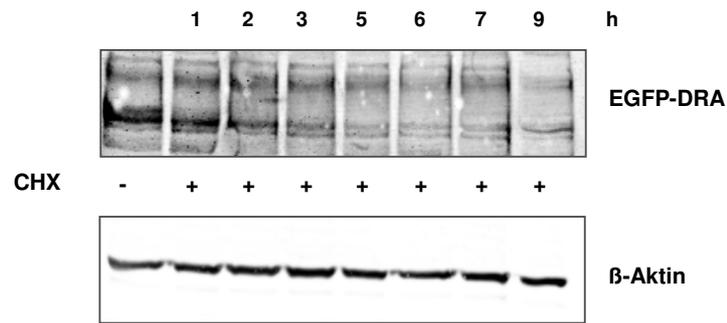


Abbildung 3.10: Expression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus an der Plasmamembran in HEK-Zellen

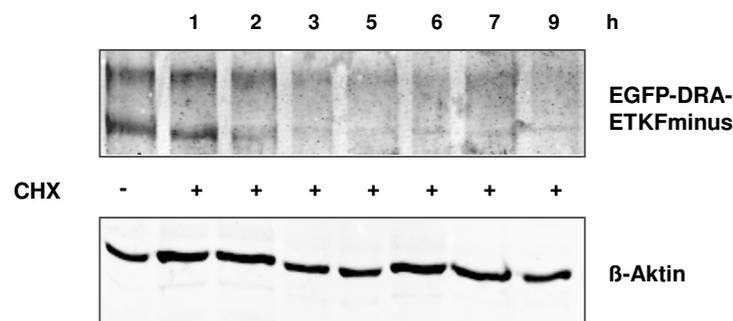
Um die Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus zu bestimmen, wurden die an der Plasmamembran exprimierten Proteine markiert mittels NHS-SS-Biotin, isoliert durch Streptavidin-gekoppelte Agarose und analysiert mittels SDS-PAGE und Western Blot. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden detektiert mit einem spezifischen Anti-EGFP-Antikörper und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus werden zu gleichen Anteilen in der Plasmamembran exprimiert ($23 \pm 7\%$ EGFP-DRA; $24 \pm 3\%$ EGFP-DRA-ETKFminus; $p > 0,05$) Anzahl der Experimente $n = 6$.

Zusätzlich zu diesem Oberflächenbiotinylierungsexperiment sollte der proteolytische Abbau von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus bestimmt werden. Hierfür wurden HEK-Zellen, die stabil EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-EKTFminus exprimieren, für 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7 und 9 h mit $25 \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (CHX) inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen EGFP detektiert. Nach Quantifizierung der Bandenintensität von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus wurde der prozentuale Anteil der mittleren Bandenintensität vom Ausgangswert bei 0 h (=100%) bestimmt. Cycloheximid inhibiert die Proteintranslation und kann daher für die Analyse der Halbwertszeit von Proteinen genutzt werden.

A HEK/EGFP-DRA



B HEK/EGFP-DRA-ETKFminus



C

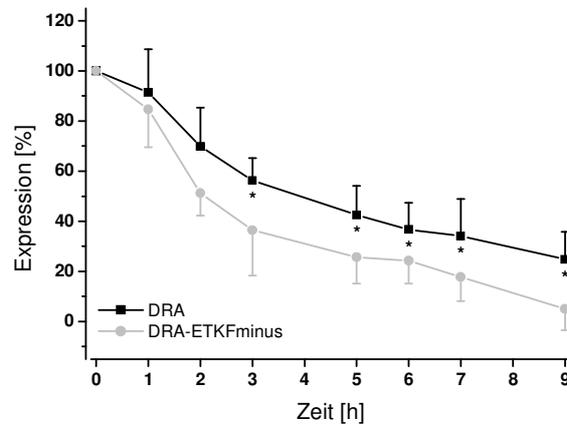


Abbildung 3.11: Das PDZ-Interaktionsmotiv beeinflusst die Degradation von DRA in HEK-Zellen

Um den Abbau von EGFP-DRA (A) und EGFP-DRA-ETKFminus (B) bestimmen zu können, wurden die Zellen mit 25 µm/ml Cycloheximid inkubiert, um die Proteinbiosynthese zu blockieren (0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 h; 37°C), und lysiert. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden detektiert mit einem spezifischen Anti-EGFP-Antikörper und fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper. Nach 3 h war mehr EGFP-DRA-ETKFminus degradiert als EGFP-DRA (p < 0,05). Anzahl der Experimente n = 5.

Abbildung 3.11 zeigt, dass die Bandenintensität von EGFP-DRA-ETKFminus im Vergleich zu EGFP-DRA schneller abnahm. Nach 5-stündiger Inkubation mit Cycloheximid konnten noch $56\pm 9\%$ von EGFP-DRA, aber nur noch $36\pm 18\%$ von EGFP-DRA-ETKFminus detektiert werden ($p < 0,05$). Ähnliches gilt nach 6-stündiger Cycloheximid-Inkubation. Hier wurden noch $43\pm 12\%$ EGFP-DRA nachgewiesen, wohingegen der Anteil von EGFP-DRA-ETKFminus schon auf $26\pm 11\%$ absank ($p < 0,05$). EGFP-DRA-ETKFminus wird folglich rascher abgebaut als DRA.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Plasmamembranexpression von DRA und DRA-ETKFminus vergleichbar ist, aber das PDZ-Interaktionsmotiv DRA vor dem lysosomalen Abbau schützt. DRA-ETKFminus wird schneller proteolytisch degradiert.

3.5 Subzelluläre Lokalisation von DRA

Die generierten Ergebnisse zeigen, dass ein enges Zusammenspiel zwischen PDZ-Interaktion, Lipid Raft-Assoziation, PI3-Kinase und der Transportaktivität und Plasmamembranexpression von DRA besteht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DRA und DRA-ETKFminus unterschiedlich schnell degradiert werden. Die Insertion von NHE3 in die Plasmamembran ist ein PI3-Kinase abhängiger Schritt (Murtazina et al., 2006). Eine Inhibition der PI3-Kinase führt zu einer Akkumulation von NHE3 in endosomalen Strukturen und zu einer daraus resultierenden Abnahme der Oberflächenexpression (Kurashima et al., 1998).

Als nächstes sollte aus diesem Grunde die intrazelluläre Verteilung von DRA und DRA-ETKFminus in verschiedenen Endosomen-Populationen (frühe Endosomen, späte Endosomen und recycling Endosomen) untersucht werden.

3.5.1 Isolation von Rab5-, Rab7- und Rab11-haltigen Vesikeln mittels Sucrose-Gradienten-Zentrifugation und Immunisolierung

Um die subzelluläre Lokalisation von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus aufzuklären, sollte eine Immunisolierung von frühen, späten und recycling Endosomen durchgeführt werden. Hierfür wurden Endosomen in einem Sucrose-Gradienten angereichert und anschließend mittels Antikörper gegen das spezifische „Endosomen-Marker-Protein“ isoliert. Rab11 findet sich in recycling Endosomen, Rab5 ist ein Marker-Protein für frühe Endosomen und Rab7 findet sich ausschließlich in späten Endosomen (siehe Kapitel 1.5).

3.5.1.1 Klonierung von humanen Rab5a, Rab7a und Rab11a

Die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen Rab11, Rab7 und Rab5 eigneten sich leider nicht für die Immunisolierung. Deshalb wurden Rab5a, Rab7a und Rab11a als mCherry-HA-Fusionsproteine generiert, um anschließend die Immunisolierung mit HA-gekoppelter Agarose durchzuführen (siehe Kapitel 3.5.1.3). Rab5a, Rab7a und Rab11a wurden in den Vektoren pDsRed2-HA-Rab5a, pDsRed-HA-Rab7a und pDsRed-HA-Rab11a von Addgene angeboten. Die Rab-Proteine wurden umkloniert in pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab5a, -7a bzw. -11a (siehe Kapitel 2.1.11) und anschließend stabil transfiziert in HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen. Um die Expression der mCherry-HA-Rab-Proteine zu überprüfen, wurden Zelllysate hergestellt und die Proteine mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion analysiert. mCherry-HA-RabGTPasen und die endogenen RabGTPasen wurden mittels spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Rab11a, Rab7a und Rab5a detektiert. Des Weiteren wurde die Expression der mCherry-HA-Konstrukte überprüft mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt und die Auswertung erfolgte an einem ApoTome.

Abbildung 3.12 zeigt die Expression von mCherry-HA-Rab5a (A), -Rab7a (B) und -Rab11a (C) als rote Fluoreszenz. Im Overlay ist zu erkennen, dass nicht alle selektierten Zellen eine rote Fluoreszenz aufweisen. Es wäre denkbar, dass die Expression von mCherry (und somit der RabGTPasen) in manchen Zellen zu gering ist und nicht im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann. Die Expression der mCherry-HA-Rab-Proteine wurde zusätzlich im Western Blot überprüft (mCherry 29 kDa; HA 9 kDa; Rab5a 25 kDa; Rab7a 24 kDa; Rab11a 25 kDa). Zur Kontrolle, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, überprüfte man die endogene Expression der RabGTPasen. Abbildung 3.12 zeigt, dass in HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen die Expression der mCherry-HA-Rab-Proteine vergleichbar war, so dass diese Zellen eingesetzt werden konnten für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus mittels Immunisolierung.

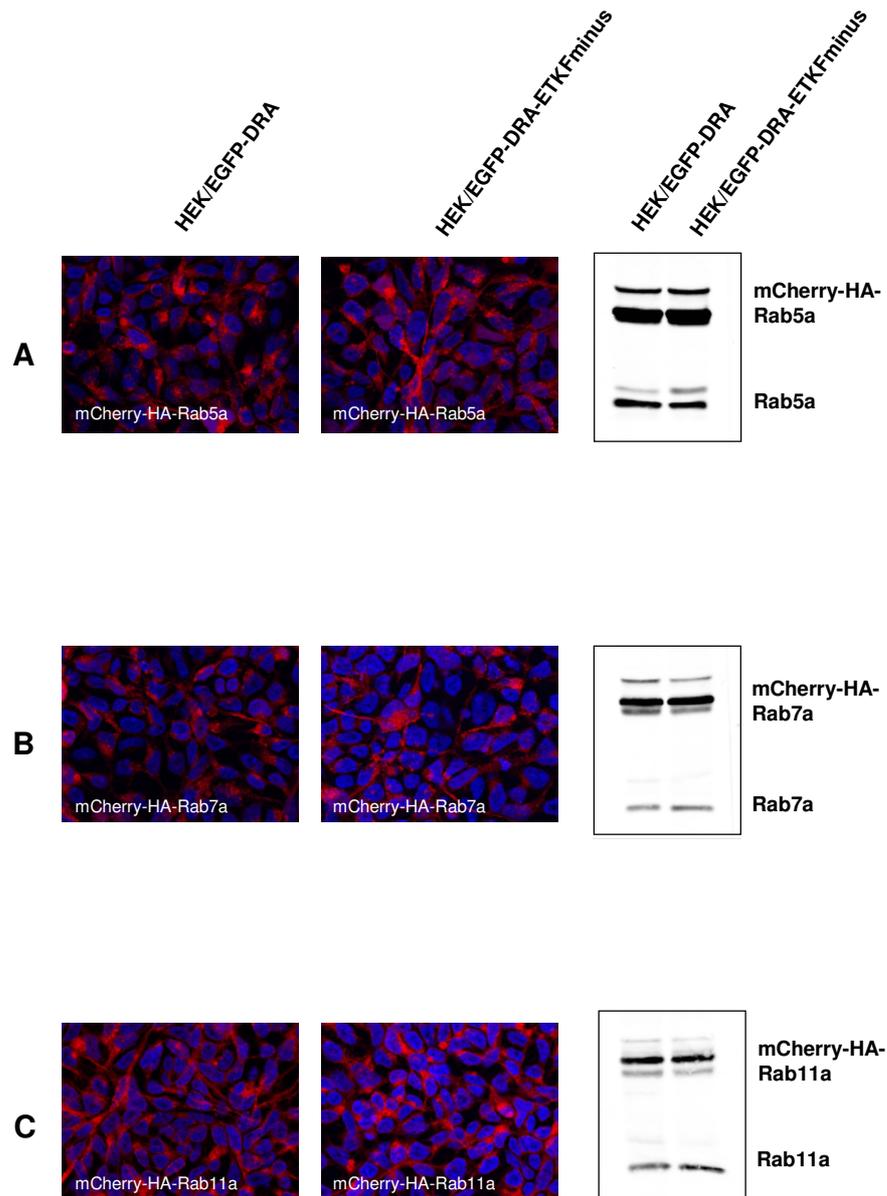


Abbildung 3.12: Expression von mCherry-HA-Rab5a, -7a und -11a in HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKfminus-Zellen

Die Zellen wuchsen auf Glas-Coverslips, wurden in 4% Formaldehyd fixiert und die Zellkerne angefärbt mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Dapi. Die Präparate wurden an einem ApoTome mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x) betrachtet. Lysate der Zellen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (50 μg Protein). mCherry-HA-Rab5a, -7a, -11a sowie die endogenen Rab-Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern (Anti-Rab5a, Anti-Rab7a, Anti-Rab11a) und Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern detektiert.

3.5.1.2 Flotationsmuster von Endosomen-Populationen im Sucrose-Gradienten

Die Gewinnung eines mit Endosomen angereicherten Ausgangsmaterials ist Voraussetzung für das Gelingen der Immunisolierung. Der direkte Einsatz eines postnukleären Überstandes (PNS) war nicht möglich, da Quencheffekte von zytosolischen RabGTPasen die Immunisolierung ineffizient werden ließen.

Für die Immunisolierung wurden HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen eingesetzt, die stabil transfiziert wurden mit mCherry-HA-Rab5a, mCherry-HA-Rab7a und mCherry-HA-Rab11a. Um mit Endosomen angereicherte Fraktionen zu erhalten, wurde ein diskontinuierlicher Sucrose-Gradient (20/35/40%-Sucrose) gegossen. Während einer Ultrazentrifugation reichern sich Endosomen auf Grund ihrer Dichte zwischen 20% und 35% Sucrose an. Nach der Zentrifugation wurden fünf Fraktionen von oben beginnend (Fraktion 1) abgenommen. Der größte Anteil der Fraktion 2 (Interphase 20%/35%-Sucrose) wurde für die Immunisolierung eingesetzt, der restliche Anteil sowie die Fraktionen 1 und 3-5 wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Rab5, Rab7 und Rab11 (exogene Expression (mCherry-HA-Fusionsproteine) oder endogene Expression) mit dem jeweiligen spezifischen monoklonalen Antikörper (Anti-Rab5, Anti-Rab7, Anti-Rab11). Nach Quantifizierung der Bandenintensität von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen (exogene und endogene Expression) wurde die Anreicherung dieser Proteine in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität der in Fraktion 2 vorliegenden Proteinmenge zu der Bandenintensität des gesamten Proteins im PNS.

In mCherry-HA-Rab5a (Abbildung 3.13 A) überexprimierten HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen wurde mCherry-HA-Rab5a um den Faktor $2 \pm 1,2$ in der Fraktion 2 angereichert (in HEK/EGFP-DRA $2,2 \pm 0,6$; in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus $2,2 \pm 1,2$; $p > 0,05$). Endogen exprimiertes Rab5a wurde um den Faktor $2 \pm 0,5$ in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose angereichert (in HEK/EGFP-DRA $1,9 \pm 1,0$; in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus $2,5 \pm 0,02$; $p > 0,05$). Auffällig ist, dass sich mCherry-HA-Rab5a stärker über den Gradienten verteilt als das endogene Rab5a. EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus reicherten sich um den Faktor $3,7 \pm 1,95$ in der Fraktion 2 an (EGFP-DRA $3,4 \pm 2,1$; EGFP-DRA-ETKFminus $3,9 \pm 1,7$; $p > 0,05$).

Abbildung 3.13 B: mCherry-HA-Rab7a zeigte ein ähnliches Flotationsmuster wie mCherry-HA-Rab5a. mCherry-HA-Rab7a reicherte sich in der Fraktion 2 um den Faktor $2,1 \pm 0,6$ an (in HEK/EGFP-DRA $2,2 \pm 0,6$; in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus $1,9 \pm 0,6$; $p > 0,05$). Endogen

exprimiertes Rab7a wurde um den Faktor $2,6 \pm 0,75$ angereichert (in HEK/EGFP-DRA $2,8 \pm 1,0$; in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus $2,3 \pm 0,5$; $p > 0,05$). Bei EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus lag der Anreicherungsfaktor bei $2 \pm 0,25$ (EGFP-DRA $1,9 \pm 0,4$; EGFP-DRA-ETKFminus $2,2 \pm 0,1$; $p > 0,05$).

Die Anreicherung von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus in mCherry-HA-Rab11a exprimierenden Zellen betrug $3,9 \pm 1,75$ (EGFP-DRA $3,5 \pm 1,3$; EGFP-DRA-ETKFminus $4,3 \pm 2,2$; $p > 0,05$). mCherry-HA-Rab11a reicherte sich um den Faktor $1,9 \pm 0,4$ an (in HEK/EGFP-DRA $1,2 \pm 0,3$; in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus $1,4 \pm 0,4$; $p > 0,05$) und endogen exprimiertes Rab11a um den Faktor $1,5 \pm 0,2$ (in HEK/EGFP-DRA $1,3 \pm 0,3$; in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus $1,6 \pm 0,1$; $p > 0,05$) (Abbildung 3.13 C).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich recycling Endosomen (Rab11a), frühe Endosomen (Rab5a) und späte Endosomen (Rab7a) trotz ihrer unterschiedlichen Proteinzusammensetzung und unterschiedlicher Funktion nicht in ihrer Dichte unterscheiden und sich in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose anreichern. Zum Teil können mCherry-HA- und endogen exprimierte Rab-Proteine in Fraktionen höherer Dichte detektiert werden. Ursache hierfür könnte sein, dass beim Homogenisieren der Zellen einige Zellkerne aufgebrochen und DNA freigesetzt wurde. Freie DNA kann ein Verklumpen von Zellorganellen zur Folge haben. Solche Aggregate flottieren dann im Sucrose-Gradienten in Fraktionen höherer Dichte. EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus reicherten sich in der Interphase auch zwischen 20 und 35% Sucrose an. Auf Grund des gewählten Sucrose-Gradienten reichern sich in dieser Fraktion auch Teile der Plasmamembran an.

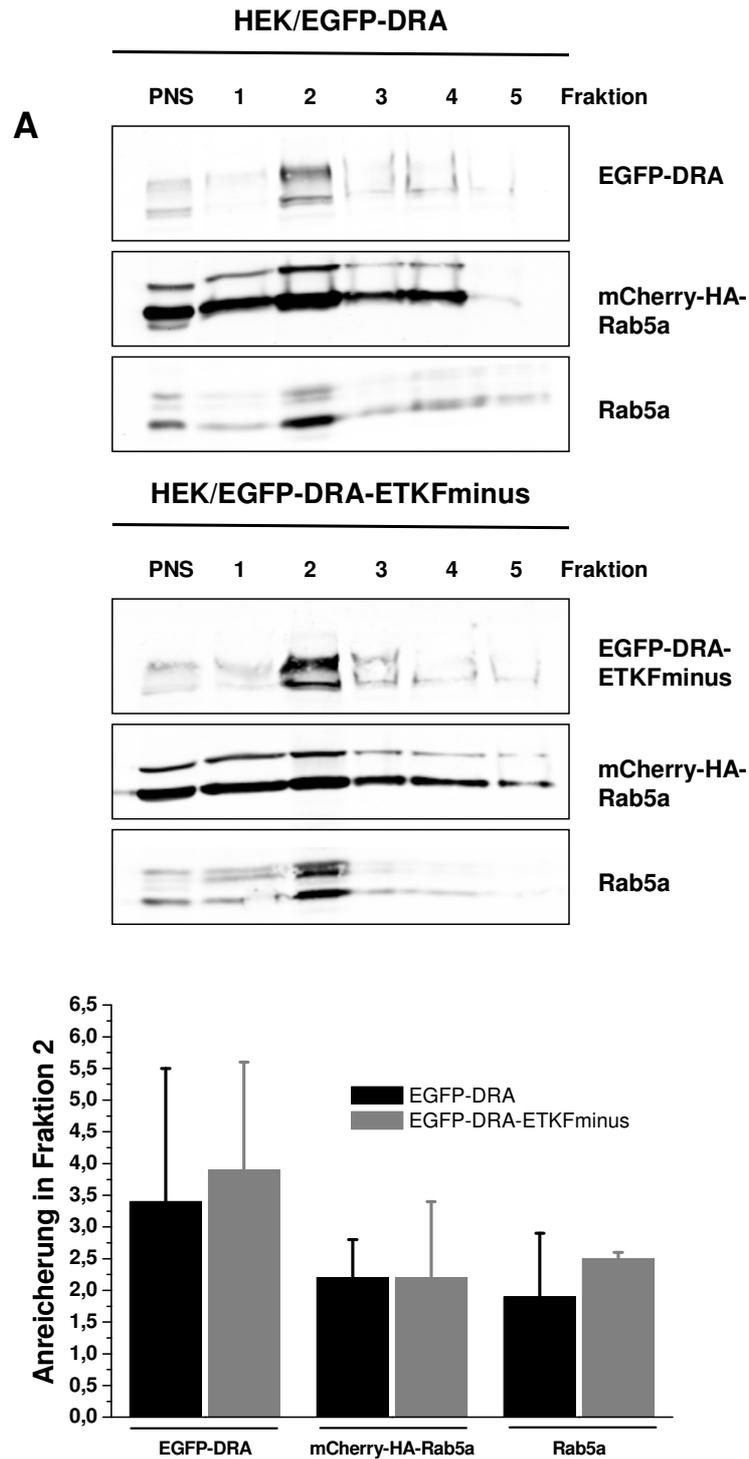


Abbildung 3.13 A: Anreicherung von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus sowie exogen und endogen exprimiertem Rab5a in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose
 HEK/EGFP-DRA und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus, die stabil mCherry-HA-Rab5a exprimieren, wurden homogenisiert. Nach Abtrennung von Zellkernen und Zellresten wurde das PNS auf einen Sucrose-Gradienten (20/35/40% Sucrose) aufgetragen. Nach Ultrazentrifugation wurden von oben 5 Fraktionen abgenommen und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Rab5a (exogene und endogene Expression; Anti-Rab5a). Anzahl der Experimente n = 3.

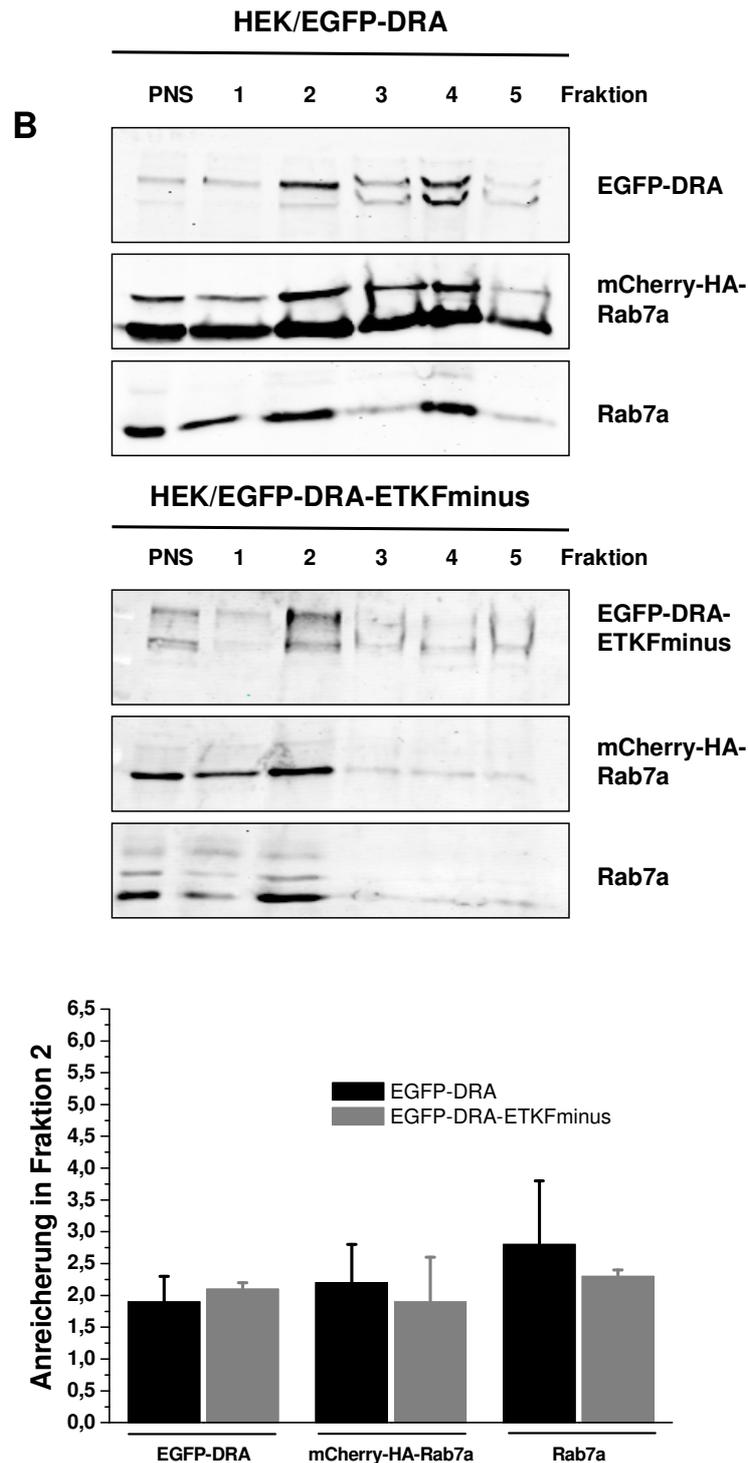


Abbildung 3.13 B: Anreicherung von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus sowie exogen und endogen exprimiertem Rab7a in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose

HEK/EGFP-DRA und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus, die stabil mCherry-HA-Rab7a exprimieren, wurden homogenisiert. Nach Abtrennung von Zellkernen und Zellresten wurde das PNS auf einen Sucrose-Gradienten (20%/35%/40% Sucrose) aufgetragen. Nach Ultrazentrifugation wurden von oben 5 Fraktionen abgenommen und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Rab7a (exogene und endogene Expression; Anti-Rab7a). Anzahl der Experimente $n = 3$.

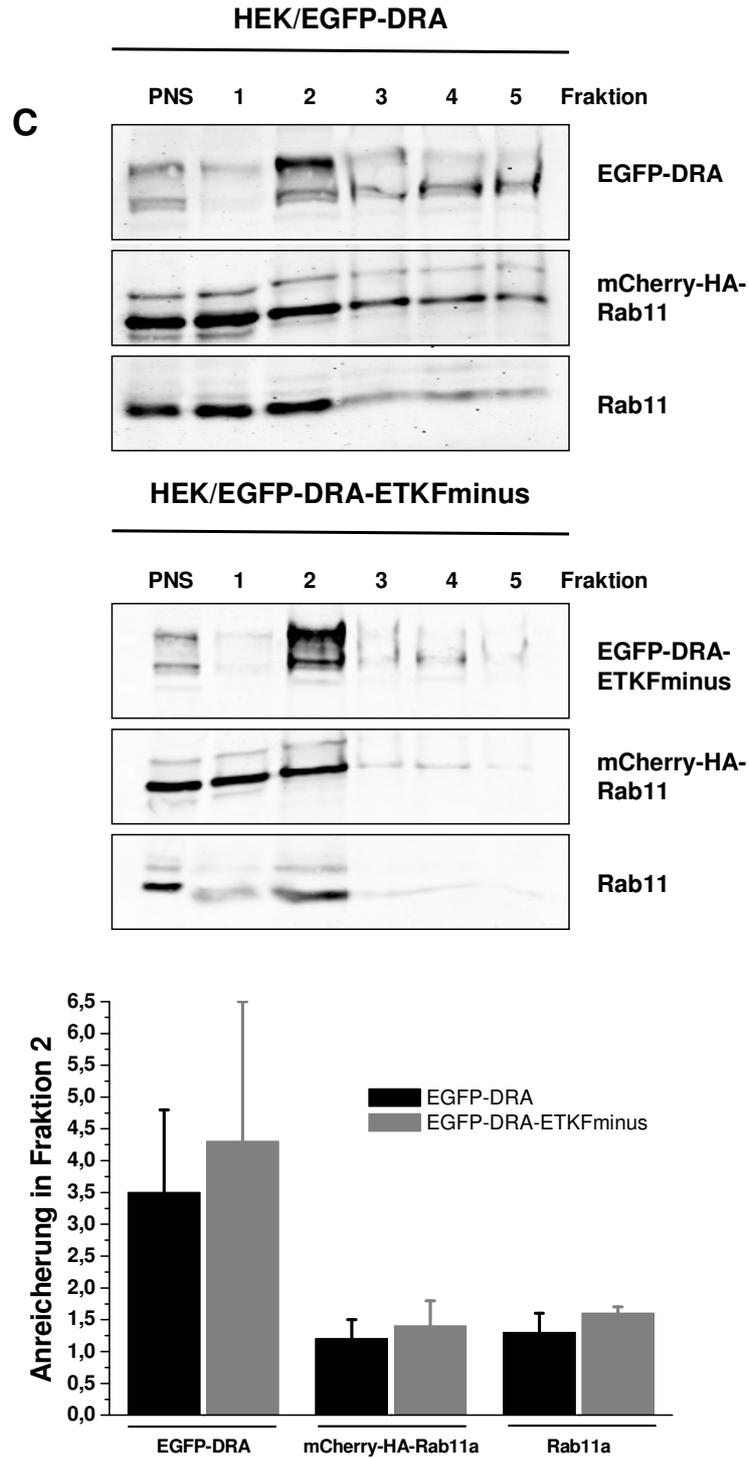


Abbildung 3.13 C: Anreicherung von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus sowie exogen und endogen exprimiertem Rab11a in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose
 HEK/EGFP-DRA und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus, die stabil mCherry-HA-Rab11a exprimieren, wurden homogenisiert. Nach Abtrennung von Zellkernen und Zellresten wurde das PNS auf einen Sucrose-Gradienten (20/35/40% Sucrose) aufgetragen. Nach Ultrazentrifugation wurden von oben 5 Fraktionen abgenommen und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Rab11a (exogene und endogene Expression; Anti-Rab11a). Anzahl der Experimente n = 3.

3.5.1.3 Isolation von frühen, späten und recycling Endosomen mittels Immunisolation

Die Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose (Fraktion 2) wurde für die Immunisolation eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.8.1). Die Fraktion wurde über Nacht inkubiert mit HA-gekoppelter Agarose. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Rab5, Rab7 und Rab11 (exogene Expression als mCherry-HA-Fusionsproteine oder endogene Expression) mit dem jeweiligen spezifischen monoklonalen Antikörper (Anti-Rab5, Anti-Rab7, Anti-Rab11). Nach Quantifizierung der Bandenintensität von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen (exogene und endogene Expression) wurde der isolierte Anteil dieser Proteine ermittelt durch die Normalisierung der Bandenintensität der isolierten Fraktion zu der Bandenintensität des gesamten Proteins in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose.

Die RabGTPasen sind über ihr C-terminales Ende auf der zytoplasmatischen Seite an Endosomen über Geranylgeranyl-Reste gekoppelt. Das N-terminale Ende ragt ins Zytoplasma. Dieses N-terminale Ende ist fusioniert mit mCherry und HA und kann somit von Anti-HA-Antikörpern bzw. Anti-mCherry-Antikörpern erkannt werden. Die Immunisolation wurde mit Anti-HA-gekoppelter Agarose durchgeführt und nicht mit Anti-mCherry-gekoppelter Sepharose, da erste Versuche zeigten, dass die Immunisolation mit Anti-mCherry-gekoppelter Sepharose das Ergebnis verfälschte, da Rab-Proteine unspezifisch an die verwendete Sepharose banden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.14 A-C zeigt die Ergebnisse der Immunisolation. In diesen Abbildungen A-C ist links das mit Endosomen angereicherte Ausgangsmaterial (Fraktion 2) dargestellt. In der Mitte sind die Immunpräzipitationen der mit mCherry-HA fusionierten Rab-Proteine sowie die Co-Immunpräzipitationen der nativen Rab-Proteine und EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus dargestellt (B = bound). Auf der rechten Seite befinden sich die nicht gebundenen Anteile der Proteine (exogene und endogene RabGTPasen sowie EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus; NB = non-bound) nach erfolgter Immunisolation.

Abbildung 3.14 A zeigt die Immunisolation von Rab5a-haltigen Vesikeln (frühe Endosomen). mCherry-HA-Rab5a und endogenes Rab5a wurden mit etwa gleicher Effizienz immunisoliert bzw. co-isoliert. (mCherry-HA-Rab5a: HEK/EGFP-DRA: $16\pm 4\%$; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: $22\pm 9\%$; $p > 0,05$; Rab5a: HEK/EGFP-DRA: $30\pm 6\%$; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: $20\pm 10\%$; $p > 0,05$). Darüber hinaus wurden auch EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus in beiden Zelllinien vergleichbar co-isoliert (EGFP-DRA:

30±30%; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: 21±27%; $p > 0,05$). DRA findet sich somit in frühen Endosomen unabhängig von seinem PDZ-Interaktionsmotiv. Außergewöhnlich war, dass der isolierte Anteil von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus sehr stark schwankte, obwohl die Immunpräzipitation von mCherry-HA-Rab5a sowie die Co-Isolation von Rab5a sehr konstant waren. Die Ursache hierfür bleibt vorerst ungeklärt. Möglicherweise spiegelt dieser Effekt eine regulierte Internalisierung von DRA wider.

In Abbildung 3.14 B ist die Immunisolierung von Rab7a-haltigen Endosomen (späten Endosomen) dargestellt. mCherry-HA-Rab7a wurde in HEK/EGFP-DRA- und in HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen mit vergleichbarer Effizienz immunisoliert (HEK/EGFP-DRA: 19±6%; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: 13±3%; $p > 0,05$). Auch war die Co-Immunisolierung von endogenen Rab7a in beiden Zellen vergleichbar (HEK/EGFP-DRA: 16±4%; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: 16±8%; $p > 0,05$). Die Co-Immunisolierung von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus war mit 0,5±0,1% und 14±7% jedoch markant unterschiedlich ($p < 0,05$). Diese Daten deuten an, dass das PDZ-Interaktionsmotiv DRA vor dem lysosomalen Abbau schützt.

Abbildung 3.14 C zeigt die Immunisolierung von recycling Endosomen (Rab11a-haltige Endosomen). Entsprechend den Immunisolierungen von Rab5a und Rab7a wurde mCherry-HA-Rab11a in HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen zu gleichen Anteilen immunisoliert (HEK/EGFP-DRA: 19±7%; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: 19±9%; $p > 0,05$). Ferner wurde endogenes Rab11a in beiden Zelllinien vergleichbar co-isoliert (HEK/EGFP-DRA: 17±4%; HEK/EGFP-DRA-ETKFminus: 11±5%; $p > 0,05$). Die Co-Immunisolierung von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus indessen unterschiedlich. EGFP-DRA wurde zu 31±8% in Rab11a-haltigen Vesikeln co-immunisoliert. EGFP-DRA-ETKFminus konnte hingegen nur zu 7±5% mit recycling Endosomen co-immunisoliert werden ($p < 0,05$). Diese Daten legen nahe, dass das PDZ-Interaktionsmotiv nötig für den Übergang von DRA aus frühen Endosomen zu recycling Endosomen ist.

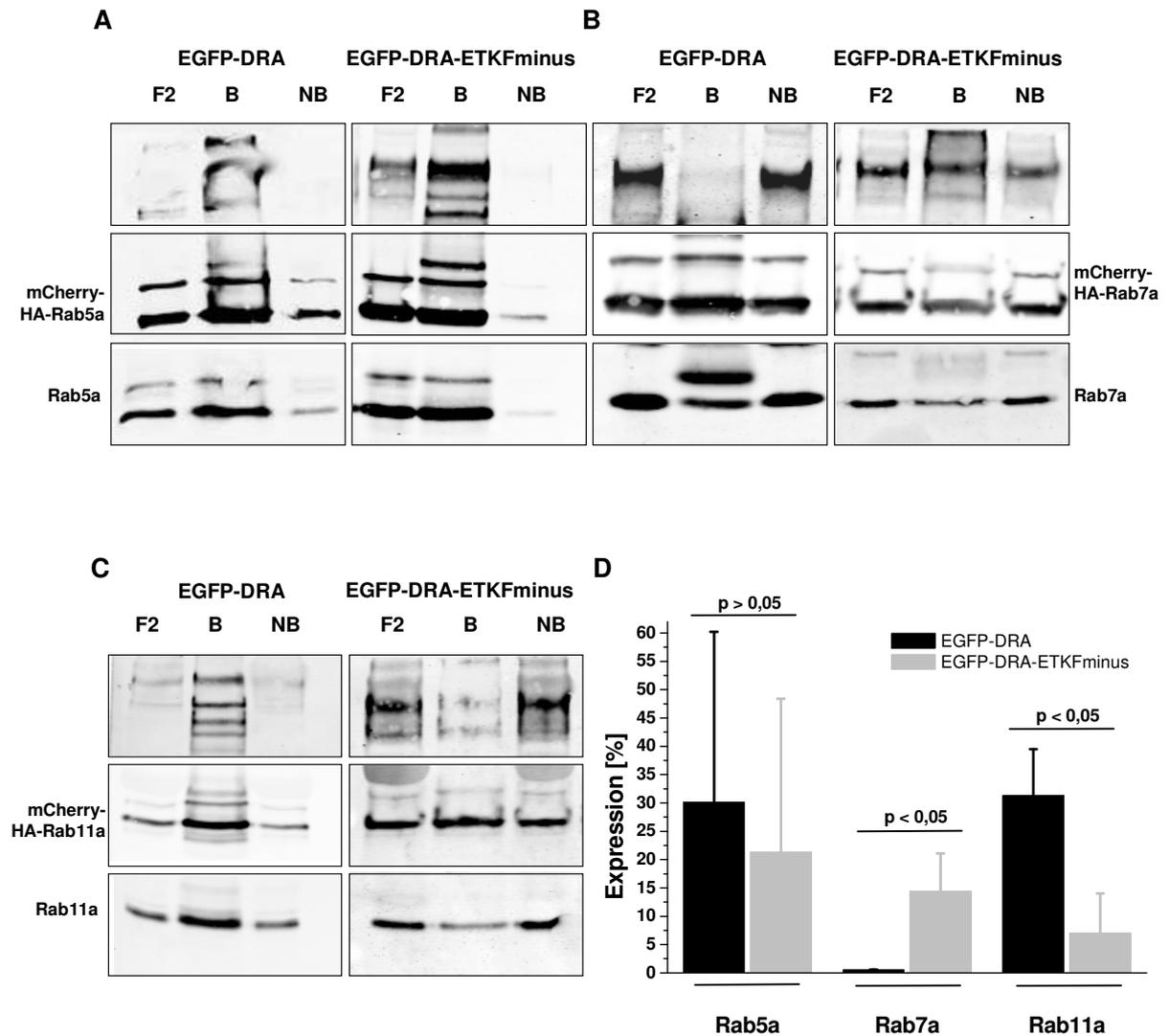


Abbildung 3.14: Immunisolierung von frühen, späten und recycling Endosomen in HEK-Zellen
 Aus HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen, die stabil mCherry-HA-Rab5a, -7a und -11a exprimieren, wurde ein mit Endosomen angereichertes Ausgangsmaterial hergestellt. Dieses wurde mit HA-gekoppelter Agarose inkubiert, um über mCherry-HA-Rab5a, -7a bzw. -11a intakte Endosomen zu isolieren. Anschließend wurden die isolierten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), darüber hinaus Rab5, Rab7 und Rab11 (exogene und endogene Expression; Anti-Rab5a, Anti-Rab7a, Anti-Rab11a). A: Immunisolierung aus mCherry-HA-Rab5a stabil transfizierten Zellen; EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus sind in frühen Endosomen lokalisiert B: Immunisolierung aus mCherry-HA-Rab7a stabil transfizierten Zellen; EGFP-DRA-ETKFminus ist in späten Endosomen lokalisiert, nicht aber EGFP-DRA C: Immunisolierung aus mCherry-HA-Rab11a stabil transfizierten Zellen; EGFP-DRA ist in recycling Endosomen lokalisiert, EGFP-DRA-ETKFminus ist zu einem geringeren Anteil mit recycling Endosomen assoziiert D: Zusammenfassung der Experimente. (F2: Ausgangsmaterial; B: bound; NB: non-bound).

Es kann vermutet werden, dass DRA unabhängig der PDZ-Interaktion in frühe Endosomen gelangt. Das Recycling von DRA zurück zur Plasmamembran über Rab11-haltige Vesikel jedoch abhängig von dem PDZ-Interaktionsmotiv ist und folglich von der Interaktion von DRA mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen.

Um gewiss zu sein, dass durch die Immunisolierung intakte Endosomen isoliert wurden, wurde eine Hälfte der Fraktion 2 (mit Endosomen angereicherte Fraktion) mit Anti-HA-gekoppelter Agarose inkubiert, um Endosomen zu isolieren. Die zweite Hälfte der Fraktion 2 wurde hingegen mit 1% Triton-X100 (TX100) inkubiert, um die Endosomen aufzubrechen, so dass keine Co-Immunisolierung mehr möglich war. Anschließend wurde auch dieser Teil der Fraktion 2 mit Anti-HA-gekoppelter Agarose inkubiert. Beide Proben wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion analysiert. EGFP-DRA wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen EGFP detektiert und das endogene Rab11a sowie mCherry-HA-Rab11a mit einem monoklonalen Anti-Rab11a-Antikörper. Durch die Inkubation des mit Endosomen angereicherten Ausgangsmaterials mit TX100 und das daraus resultierende Aufbrechen der Endosomen darf nach Inkubation mit Anti-HA-gekoppelter Agarose nur mCherry-HA-Rab11a präzipitiert werden. Die Co-Immunisolierung von endogenem Rab11a sowie EGFP-DRA müsste fehlschlagen.

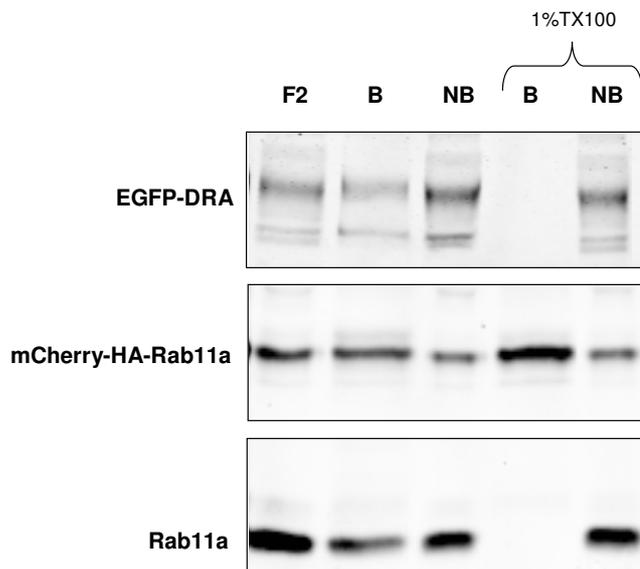


Abbildung 3.15: Kontrollexperiment zur Immunisolierung in HEK-Zellen

Aus HEK/EGFP-DRA-Zellen, die stabil mCherry-HA-Rab11a exprimieren, wurde ein mit Endosomen angereichertes Ausgangsmaterial hergestellt. Ein Teil dieses Materials wurde mit HA-gekoppelter Agarose inkubiert, um über mCherry-HA-Rab11a intakte Endosomen zu isolieren. Der restliche Teil des Materials wurde mit 1% TX100 und anschließend mit HA-gekoppelter Agarose inkubiert. Die isolierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EGFP-DRA wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert (Anti-EGFP), ebenso Rab11a (exogene und endogene Expression; Anti-Rab11a). Eine Inkubation mit TX100 führte zum Verlust der Co-Isolation von nativem Rab11a und EGFP-DRA.

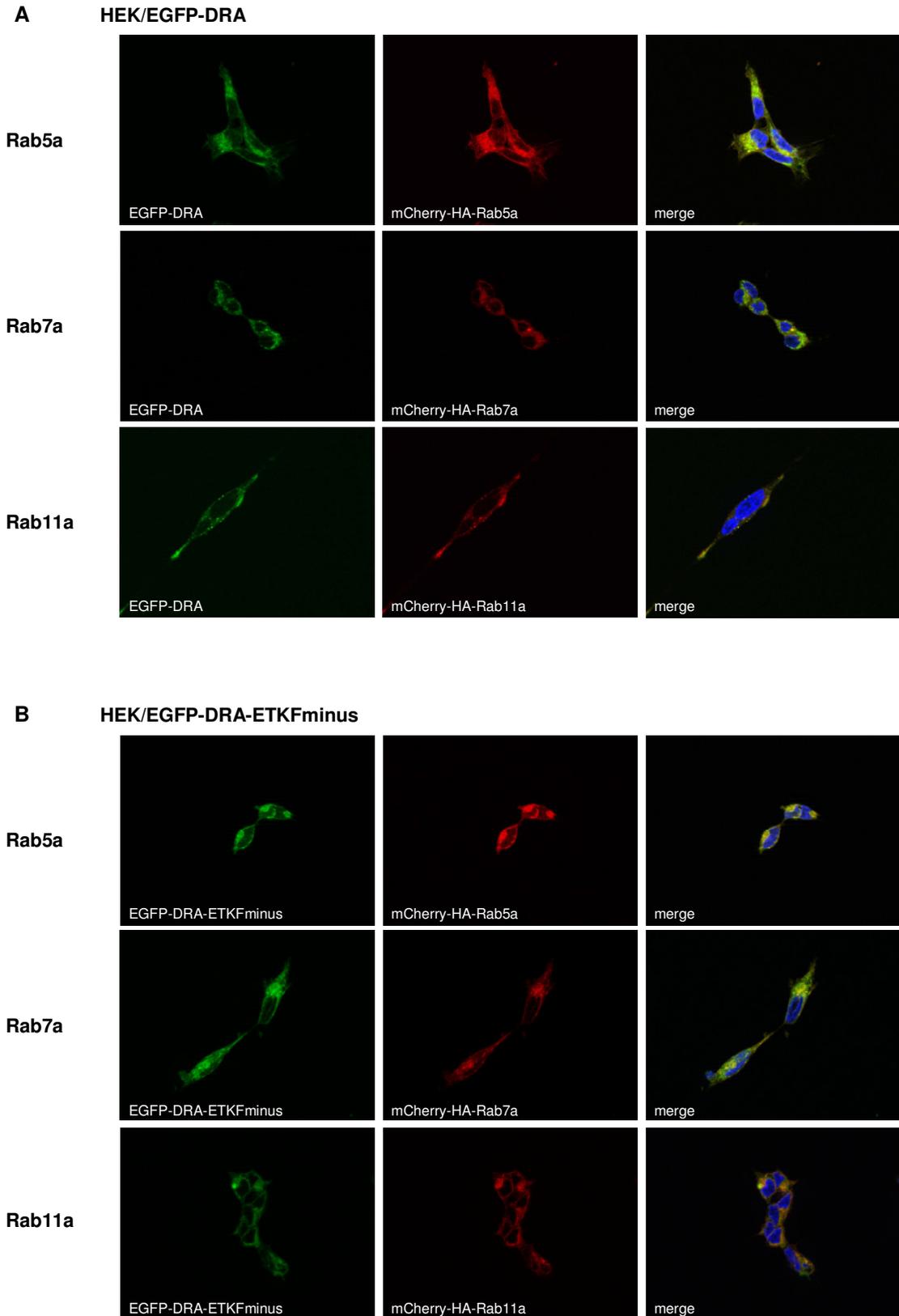
Abbildung 3.15 zeigt die Ergebnisse der Immunisolierung mit bzw. ohne Inkubation mit TX100. Ohne TX100-Inkubation wurde mCherry-HA-Rab11a immunpräzipitiert sowie das endogene Rab11a und EGFP-DRA co-immunisoliert. Mit TX100-Inkubation wurde mCherry-HA-Rab11a immunpräzipitiert. Die Co-Immunistration von EGFP-DRA und dem endogenen Rab11a war – wie erwartet- nicht mehr nachweisbar. Es konnte keine Rab11a-Bande bei 25 kDa detektiert werden sowie keine EGFP-DRA-Doppelbande bei 180 kDa und 145 kDa. Mit diesem Versuchsansatz konnte sichergestellt werden, dass durch die vorgenommene Immunisolierung wirklich intakte Endosomen isoliert werden.

3.5.2 DRA und DRA-ETKFminus sind in unterschiedlichen Endosomen-Populationen lokalisiert

Um die Ergebnisse der Immunisolierung zu bestätigen, dass DRA und DRA-ETKFminus ein unterschiedliches Expressionsmuster in den verschiedenen Endosomen-Populationen zeigen, wurde die Co-Lokalisation von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus mit den mCherry-HA-RabGTPasen untersucht. Hierfür wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät, fixiert mit Formaldehyd, die Kernfärbung mit Dapi durchgeführt und die Proben eingebettet mit FluoroSave. Die Proben wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x) eines ApoTomes betrachtet (siehe Kapitel 2.2.9). Um die Co-Lokalisation zu bestimmen, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient genutzt. Hierfür wurde mit Hilfe der ApoTome AxioVision Software die EGFP- und mCherry-Fluoreszenzintensitäten für jeden Pixel im EGFP- und mCherry-Kanal bestimmt und in einem Histogramm gegeneinander aufgetragen. Mit diesen Daten wurde anschließend nach Abzug des Hintergrundes der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 besteht ein vollständiger positiver linearer Zusammenhang, während bei -1 ein vollständiger negativer linearer Zusammenhang besteht. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die verglichenen Merkmale nicht linear voneinander ab. Das heißt, bei einem Wert von +1 besteht eine vollständige Co-Lokalisation von zwei Proteinen, bei einem Wert von 0 sind die verglichenen Proteine hingegen nicht co-lokalisiert.

Die Abbildung 3.16 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde aus mindestens vier verschiedenen Zellen bestimmt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet (Abbildung 3.16 C). EGFP-DRA sowie EGFP-DRA-ETKFminus sind partiell mit mCherry-HA-Rab5a co-lokalisiert (EGFP-DRA: PCC = $0,6 \pm 0,2$; EGFP-DRA-ETKFminus: PCC = $0,6 \pm 0,3$; $p > 0,05$). Mit mCherry-HA-Rab7a ist allerdings nur EGFP-DRA-ETKFminus partiell co-lokalisiert mit einem PCC von $0,5 \pm 0,1$. EGFP-DRA ist indessen nicht mit mCherry-HA-Rab7a co-lokalisiert (PCC =

0,1±0,1; $p < 0,05$). Mit mCherry-HA-Rab11a ist EGFP-DRA partiell co-lokalisiert. EGFP-DRA-ETKFminus zeigt nur eine schwache Co-Lokalisation mit mCherry-HA-Rab11a (EGFP-DRA: PCC = 0,6±0,2; EGFP-DRA-ETKFminus: PCC = 0,2±0,1).



C

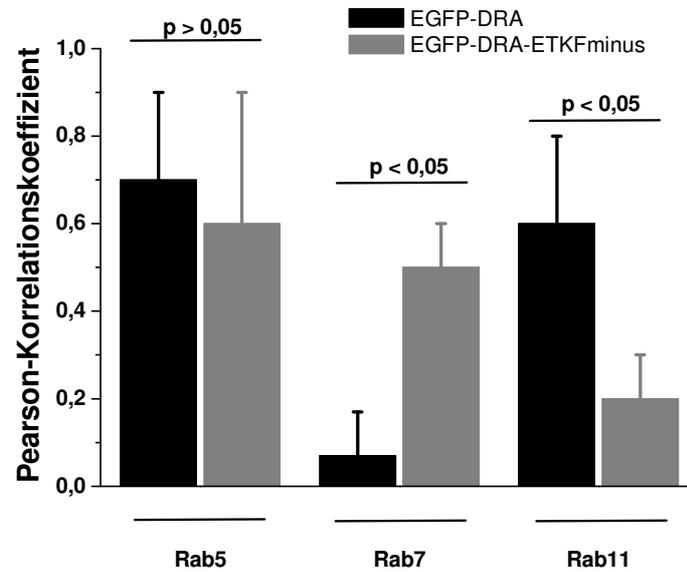


Abbildung 3.16: Co-Lokalisation von DRA mit Rab5a, Rab7a und Rab11a

HEK/EGFP-DRA/mCherry-HA-Rab5a, -7a, -11a-Zellen sowie HEK/EGFP-DRA-ETKFminus/mCherry-HA-Rab5a, -7a und -11a-Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und nach der Kernfärbung mit Dapi eingebettet mit FluoroSave. Die Proben wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x) eines ApoTomes betrachtet. Um die Co-Lokalisation zu bestimmen, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. A: HEK/EGFP-DRA B: HEK/EGFP-DRA-ETKFminus C: Pearson-Korrelationskoeffizient; Anzahl der Experimente $n = 4-6$.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die Berechnung der Pearson-Korrelationskoeffizienten bestätigen die Ergebnisse der Immunisolierung. Die Lokalisation von DRA in den unterschiedlichen Endosomen-Populationen wird beeinflusst durch dessen PDZ-Interaktionsmotiv.

3.6 Rab11a: Einfluss auf die Transportaktivität und Oberflächenexpression von DRA

Aus den Experimenten der Immunisolierung sowie aus den Untersuchungen der Fluoreszenzmikroskopie geht hervor, dass das PDZ-Interaktionsmotiv notwendig ist für den Übergang von DRA aus frühen Endosomen zu recycling Endosomen. Um den Einfluss von Rab11a auf die Aktivität von DRA zu prüfen, wurden HEK/EGFP-DRA-Zellen transient transfiziert mit mCherry-HA-Rab11a und mCherry-HA-Rab11aS25N. Bei Rab11aS25N handelt es sich um ein dominant negatives Rab11a. Anschließend wurde der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch gemessen mittels Fluorometrie. Zur Überprüfung der Transfektionsrate wurden einige Glasplättchen nicht zu den funktionellen Untersuchungen herangezogen, sondern mittels Formaldehyd fixiert, eine Kernfärbung durchgeführt und schließlich mit einem ApoTome betrachtet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Transfektionsrate von mCherry-HA-Rab11a vergleichbar ist mit der von mCherry-HA-Rab11aS25N (Abbildung 3.17). Die Transfektionsraten lagen bei ca 30-40%.

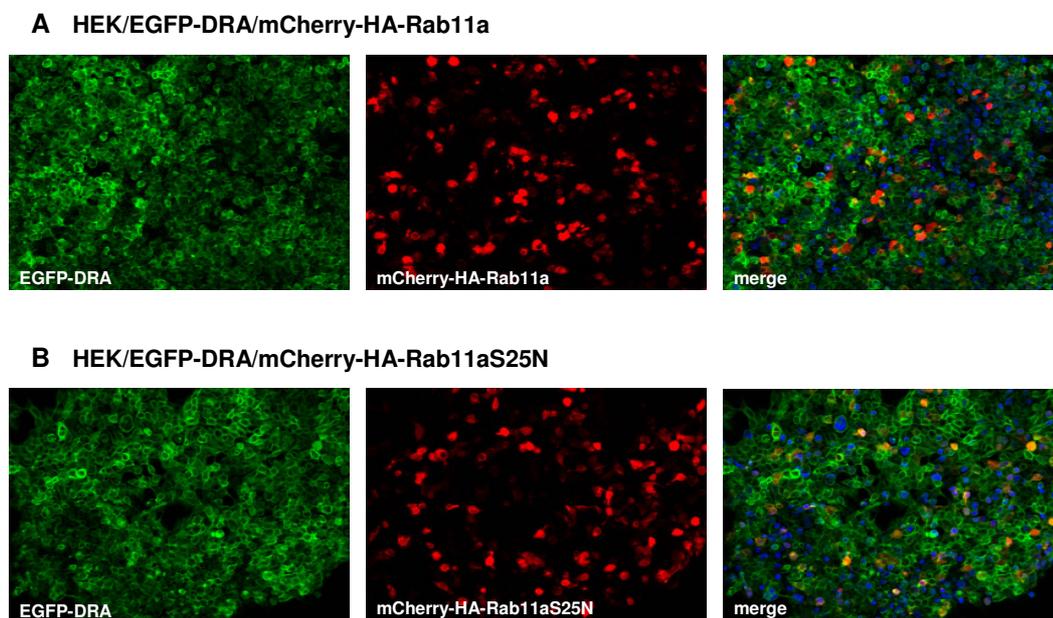


Abbildung 3.17: Expression von mCherry-HA-Rab11a und mCherry-HA-Rab11aS25N nach transienter Transfektion in HEK/EGFP-DRA-Zellen

Nach transienter Transfektion von HEK/EGFP-DRA-Zellen mit mCherry-HA-Rab11a (A) und mCherry-HA-Rab11aS25N (B) wurden die Zellen fixiert in Formaldehyd, anschließend die Kerne mittels Dapi gefärbt und eingedeckelt mittels FluoroSave. Die Proben wurden mit einem Objektiv (20x) eines ApoTomes betrachtet.

Die transiente Expression von mCherry-HA-Rab11aS25N führte zu einem verminderten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt durch DRA im Vergleich zu den Kontrollzellen, die transient mCherry-HA-Rab11a überexprimierten. Der maximale pH_i -Wert nahm um 17% ab (maximaler ΔpH_i $0,54 \pm 0,09$ vs $0,45 \pm 0,05$ -17%, $p < 0,05$; und initiale Anstieg $0,60 \pm 0,20$ pH/min vs $0,56 \pm 0,12$, -7%, $p > 0,05$) (siehe Abbildung 3.18).

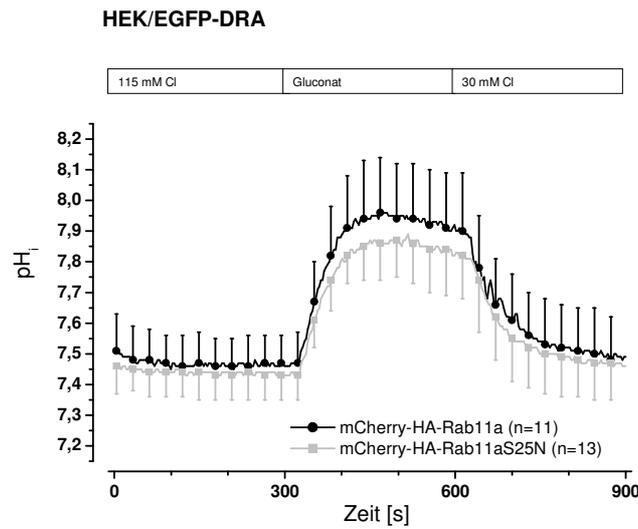


Abbildung 3.18: Einfluss der GTPase Rab11a auf die DRA-Aktivität in HEK-Zellen

HEK/EGFP-DRA wurde transient transfiziert mit mCherry-HA-Rab11a (schwarze Kurve) bzw. mCherry-HA-Rab11aS25N (dominant negatives Rab11a; graue Kurve). Anschließend wurde die DRA-Aktivität gemessen mittels Fluorometrie.

Um zu überprüfen, ob die Reduktion des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches in Korrelation steht mit einer Verminderung der Oberflächenexpression von DRA nach Transfektion mit mCherry-HA-Rab11aS25N wurden HEK/EGFP-DRA-Zellen transient transfiziert mit mCherry-HA-Rab11a, mCherry-HA-Rab11aS25N und zur Kontrolle nur mit mCherry, um anschließend die an der Plasmamembran exprimierten EGFP-DRA-Moleküle mittels Biotinylierung und Streptavidin-Präzipitation zu isolieren. Abbildung 3.19 A zeigt, dass in Kontrollzellen (nur transient mit mCherry transfiziert) $19,6 \pm 7\%$ des exprimierten DRAs an der Zelloberfläche detektiert wurde. Nach Transfektion der Zellen mit mCherry-HA-Rab11a nimmt die Oberflächenexpression von DRA um 33% zu. Es wurden $26,2 \pm 7\%$ des exprimierten DRAs an der Plasmamembran nach mCherry-HA-Rab11a-Transfektion detektiert. Eine Transfektion der Zellen mit dominant negativem Rab11a (Rab11aS25N) hingegen führt zu einer Verminderung der Oberflächenexpression von DRA um 30%. An der

Plasmamembran wurden nur noch $12,4 \pm 2,3\%$ des exprimierten DRAs detektiert (Kontrollzellen: $17,6 \pm 0,8$) (Abbildung 3.19 B).

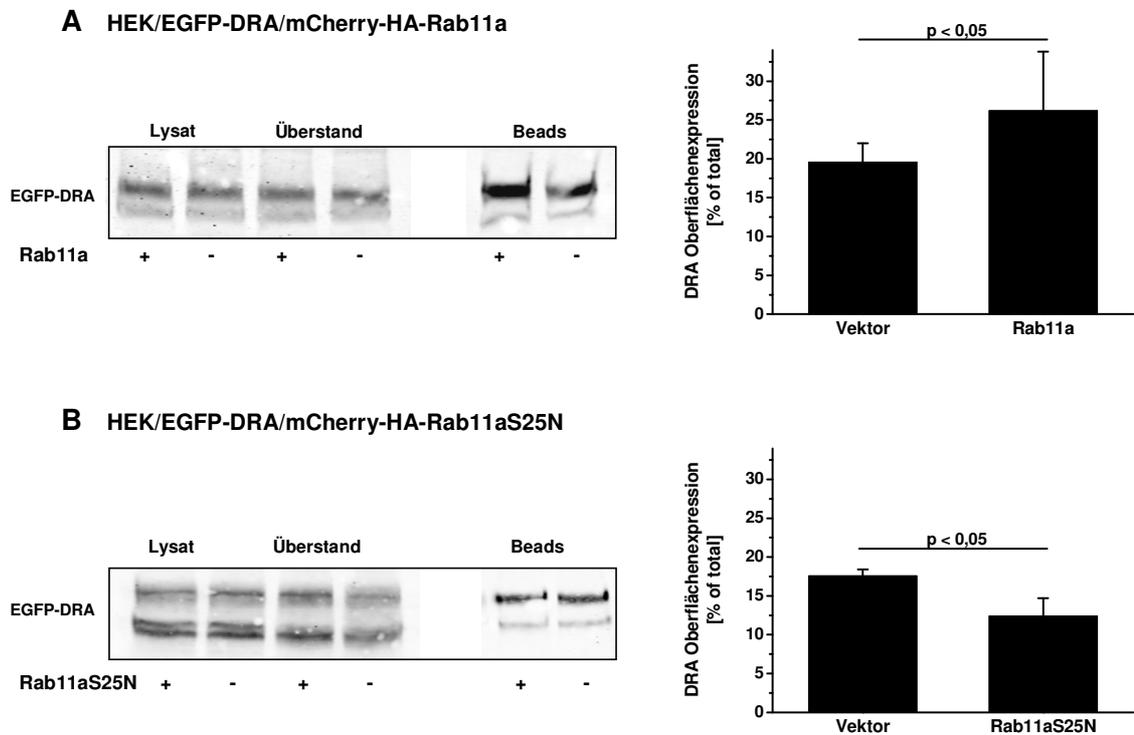


Abbildung 3.19: Einfluss der GTPase Rab11a auf die Oberflächenexpression von DRA in HEK-Zellen

Um die Oberflächenexpression von EGFP-DRA nach Transfektion mit mCherry-HA-Rab11a (A) und mCherry-HA-Rab11aS25N (B) zu bestimmen, wurden die an der Plasmamembran exprimierten Proteine markiert mittels NHS-SS-Biotin, isoliert durch Streptavidin-gekoppelter Agarose und analysiert mittels SDS-PAGE und Western Blot. EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden detektiert mit einem spezifischen Anti-EGFP-Antikörper und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Die Transfektion mit mCherry-HA-Rab11a führte zu einer Steigerung der Oberflächenexpression von EGFP-DRA, während eine Transfektion mit mCherry-HA-Rab11aS25N eine Reduktion zur Folge hatte. Anzahl der Experimente $n = 4$.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass der durch DRA vermittelte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch abhängig ist von Rab11a. Dies lässt vermuten, dass DRA über recycling Endosomen in die Plasmamembran eingebaut wird.

4 DISKUSSION

4.1 Die Insertion von DRA in die Plasmamembran: Einfluss von Lipid Rafts, der PI3-Kinase und PDZ-Adapter- proteinen

NHE3 und DRA sind partiell in Lipid Rafts lokalisiert. Diese Raft-Assoziation von NHE3 ist essentiell für dessen normale Aktivität sowie für dessen basales und stimuliertes Trafficking. Rafts sind von Bedeutung für die von der PI3-Kinase abhängige Exozytose sowie für die basale Endozytose von NHE3 (Murtazina et al., 2006). Des Weiteren erhöht eine Stimulation mit EGF den Anteil an NHE3 in Lipid Rafts und führt zu einem gesteigerten Na^+/H^+ -Austausch (Li et al., 2001). Auf Grund der funktionellen Kopplung von NHE3 und DRA können die Erkenntnisse zur Raft-Assoziation von NHE3 als Paradigma für DRA gelten. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass die partielle Raft-Assoziation von DRA auch essentiell für den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch ist. Beide Transportproteine interagieren mit den PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie, die eine entscheidende Rolle für die Regulation der Elektrolyt- und Wasser-Resorption spielen. Das PDZ-Interaktionsmotiv von DRA interagiert mit der zweiten PDZ-Domäne von NHERF2 (Lamprecht et al., 2002) sowie der zweiten und dritten PDZ-Domäne von NHERF3 (Rossmann et al., 2005), des Weiteren interagiert DRA auch mit NHERF1 und NHERF4 (Lamprecht and Seidler, 2006). Diese NHERFs vermitteln zum Beispiel die Interaktion von NHE3 mit anderen Membranproteinen, dem Zytoskelett, Proteinkinasen und weiteren Regulatorproteinen (Kim et al., 2002; Lamprecht et al., 1998; Yun et al., 1997). cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die über das Zytoskelettprotein Ezrin an NHERF1/2 bindet, und schließlich Serinreste von NHE3 phosphoryliert und somit die Transportaktivität hemmt (Lamprecht et al., 1998; Yun et al., 1997). cGMP aktiviert die cGMP abhängige Proteinkinase II (cGKII), welche mit NHERF2 interagiert und NHE3 inhibiert (Cha et al., 2005). Ca^{2+} induziert die Membran-Assoziation der Proteinkinase C (PKC) α , die mit NHERF2 und α Actinin 4 interagiert und NHE3 wiederum phosphoryliert (Kim et al., 2002). Außerdem induziert eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} eine Verminderung des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches in Abhängigkeit von NHERF3 (Lamprecht et al.,

2009). Innerhalb der Lipid Rafts interagiert DRA mit NHERF2, NHERF3 und NHERF4, nicht aber mit NHERF1.

Der physiologische Zusammenhang zwischen Lipid Raft-Assoziation und der PDZ-Interaktion bezüglich DRA- und NHE3-Aktivität war bisher noch nicht gezeigt worden. Diese Frage konnte nun beantwortet werden in HEK- bzw. Caco-2/BBE-Zellen, die stabil EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus exprimieren. Die Überexpression von Wildtyp-DRA und DRA-ETKFminus (PDZ-Interaktionsmotiv fehlt) in Zellen, die kein endogenes DRA bzw. nur geringe Mengen exprimieren, ermöglicht es spezifisch die Bedeutung der PDZ-Interaktion zu untersuchen. Ein solcher Ansatz ist in der Zellkultur, nicht jedoch in einem Tiermodell möglich, da hier nicht (bzw. nicht ohne weiteres) die DRA-Mutante exprimiert werden kann. Die durchgeführten Versuche zeigen Folgendes: (A) Eine Störung der Raft-Integrität hat eine Reduktion des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches zur Folge. In HEK-Zellen war die Inhibition der Transportaktivität abhängig von dem Vorhandensein des PDZ-Interaktionsmotivs, der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt durch DRA-ETKFminus war nicht gehemmt. In Caco-2/BBE-Zellen war hingegen die Inhibition des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches nur teilweise abhängig von der PDZ-Interaktion. Die Transportaktivität von DRA-ETKFminus war in Caco-2/BBE-Zellen auch reduziert, jedoch schwächer als der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt durch Wildtyp-DRA. (B) Eine Störung der Raft-Integrität hat eine Reduktion der Oberflächenexpression von DRA zur Folge, nicht jedoch von DRA-ETKFminus. (C) Die basale Aktivität sowie Oberflächenexpression von DRA sind abhängig von der PI3-Kinase in Abhängigkeit vom PDZ-Interaktionsmotiv. Eine Inhibition der PI3-Kinase führte zu einer Reduktion des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches sowie zu einer Verminderung der Oberflächenexpression. Die Inhibition der PI3-Kinase hatte hingegen keinen Einfluss auf die Transportaktivität sowie Oberflächenexpression von DRA-ETKFminus. (D) Lipid Rafts und die PI3-Kinase beeinflussen denselben Trafficking-Pfad von DRA, wobei eine Inhibition der PI3-Kinase keinen Einfluss nimmt auf die Raft-Assoziation von DRA und eine Störung der Raft-Integrität die Kinaseaktivität der PI3-Kinase nicht hemmt.

In einer vorausgegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass DRA und DRA-ETKFminus partiell in Rafts lokalisiert sind. Dies wurde in dieser Arbeit nochmals bestätigt. Aufgrund ihrer geringen Dichte flottieren Lipid Rafts nach kalter Extraktion in nicht ionischen Detergenzien in einem Sucrose-Gradienten nach oben. Diese *detergent resistant membranes* (DRMs) können somit von *non-resistant membranes* isoliert werden (Shogomori and Brown, 2003). Die Charakterisierung der Rafts durch diese biochemische Methode ist jedoch begrenzt. Die DRM-Fraktion repräsentiert nicht die aktuelle Organisation der einzelnen Rafts in der Zellmembran, sondern stellt eine Mischung aus

allen vorhandenen Rafts in der Zelle dar (Mayor and Maxfield, 1995). Somit können dynamische Assoziationen nur schwer nachgewiesen werden. Dies könnte ein Argument für die partielle Raft-Assoziation von DRA sein. Gleichzeitig könnte die Raft-Lokalisation von DRA aber auch spezifisch reguliert sein. Eine Stimulation mit EGF erhöht zum Beispiel den Anteil an NHE3 in Lipid Rafts und führt zu einem gesteigerten Na^+/H^+ -Austausch (Li et al., 2001). Des Weiteren induziert Vasopressin die Rekrutierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters in *detergent resistant membranes* (Welker et al., 2008). Trotz dieser nur partiellen Raft-Assoziation von DRA hat eine Störung der Raft-Integrität einen starken inhibitorischen Effekt auf die Transportaktivität und eine Reduktion seiner Plasmamembranexpression zur Folge. Somit spielen Rafts eine wichtige Rolle für die elektroneutrale NaCl -Resorption – nicht nur für NHE3, sondern auch für DRA.

In HEK-Zellen hat eine Störung der Raft-Integrität durch Entzug von Cholesterin eine Inhibition von Wildtyp-DRA zur Folge, nicht jedoch von DRA-ETKFminus. Diese Daten deuten an, dass zwischen der Raft-Assoziation und der PDZ-Interaktion von DRA eine enge und physiologisch wichtige Beziehung besteht. Eine Störung der Raft-Integrität in Caco-2/BBE-Zellen zeigte, dass die Raft abhängige Transportaktivität von DRA zwei Komponenten hat. Die eine Komponente benötigt die Interaktion mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen, während die andere unabhängig von der PDZ-Interaktion ist. In Caco-2/BBE-Zellen führt die Störung der Raft-Integrität zu einer Reduktion des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches vermittelt durch Wildtyp-DRA und DRA-ETKFminus. Wobei die Inhibition der Transportaktivität von DRA-ETKFminus schwächer war als die Reduktion des durch Wildtyp-DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches. Rafts könnten eine Rolle spielen für die Exozytose von DRA, so dass eine Störung der Raft-Integrität zu einer Reduktion der Oberflächenexpression und Transportaktivität führt. Gleichzeitig könnten die Rafts auch die Retentionszeit von DRA in der Plasmamembran beeinflussen, so dass eine Störung der Raft-Integrität zu einer erhöhten Endozytose und somit Verminderung der Oberflächenexpression und Transportaktivität von DRA führt. Interessanterweise spielt die partielle Raft-Assoziation von NHE3 sowohl für dessen basale Exozytose als auch für dessen basale Endozytose eine entscheidende Rolle (Murtazina et al., 2006).

Die PI3-Kinase spielt eine wesentliche Rolle für die Endo- und Exozytose (Lindmo and Stenmark, 2006). Eine Inhibition der durch die PI3-Kinase vermittelte Exozytose würde zu einer verminderten Plasmamembranexpression und somit zu einer reduzierten Transportaktivität eines Transportproteins führen. Bei der Inhibition der durch die PI3-Kinase vermittelten Endozytose würde man hingegen eine Zunahme der Plasmamembranfraktion und somit der Transportaktivität erwarten. Eine Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 führt in HEK-Zellen zu einer Reduktion des durch DRA

vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches. Diese verminderte Transportaktivität geht einher mit einer reduzierten Oberflächenexpression. Interessanterweise hat eine Inhibition der PI3-Kinase keinen Einfluss auf die Transportaktivität sowie Oberflächenexpression von DRA-ETKFminus. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Insertion von DRA in die Plasmamembran in Abhängigkeit von der PI3-Kinase erfolgt und dies wiederum abhängig ist von der PDZ-Interaktion.

Im Zusammenhang mit der intestinalen NaCl-Resorption wird NHE3 auch abhängig von der PI3-Kinase reguliert. Eine Inkubation von NHE3 stabil transfizierten PS120-Zellen mit einem synthetischen Aktivator der PI3-Kinase (Rhodamin- β -Ala-QRLFQVKGRR) oder Transfektion mit einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase führt zu einem gesteigerten NHE3-vermittelten Na^+/H^+ -Austausch (Lee-Kwon et al., 2001). Parallel dazu führt eine Inhibition der PI3-Kinase zu einer Akkumulation von NHE3 in intrazellulären Kompartimenten und zu einer Abnahme der Oberflächenexpression. Eine Stimulation von Caco-2-Zellen mit LPA (Lysophosphatidylsäure) oder *Lactobacillus acidophilus* erhöht die Plasmamembranexpression von DRA wahrscheinlich über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg (Raheja et al., 2010; Singla et al., 2010). In diesem Zusammenhang wurde jedoch nicht die physiologische Rolle der PDZ-Adapterproteine untersucht. Des Weiteren zeigten durchgeführte Versuche, dass eine Inhibition von Akt keine Reduktion der Transportaktivität von DRA zur Folge hat (diese Daten sind nicht dargestellt). Ein weiteres Effektorprotein der PI3-Kinase ist Rac1, welches zur Familie der Rho-GTPasen gehört (Ishikura et al., 2008). Diese kleinen GTPasen regulieren unter anderem die Organisation und den Umbau des Aktin-Zytoskeletts, die Zellmigration und den Vesikeltransport (Ridley, 2006). Die Exozytose von TRPC5 (transient receptor potential ion channel) nach EGF-Stimulation erfolgt über die Aktivierung der PI3-Kinase und der nachgeschalteten Signalkaskade unter Beteiligung von Rac1 und Phosphatidylinositol-4-Phosphate-5-Kinase (PIP(5)K α) (Bezzarides et al., 2004). Jedoch zeigten erste durchgeführte Versuche mit einem konstitutiv aktiven Rac1 (Rac1Q61L), welches transient transfiziert wurde in HEK/EGFP-DRA, dass Rac1 keinen Einfluss auf die durch die PI3-Kinase vermittelte Exozytose von DRA hat. Eine Transfektion mit Rac1Q61L erhöhte nicht die DRA-Aktivität (diese Daten sind nicht abgebildet). Somit bleibt ungeklärt, welche Effektorproteine der PI3-Kinase eine Rolle spielen für das Trafficking von DRA.

Interessanterweise vermittelt die PI3-Kinase die Zunahme der Raft-Assoziation von NHE3 und die daraus resultierende Steigerung der NHE3-Aktivität nach EGF Stimulation (Li et al., 2001). Daher sollte untersucht werden, ob zwischen der von Rafts und der PI3-Kinaseabhängigen Transportaktivität und Oberflächenexpression von DRA ein Zusammenhang besteht. Um dies zu prüfen, wurde gleichzeitig die Raft-Integrität gestört

und die PI3-Kinase inhibiert und anschließend der durch DRA vermittelte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch gemessen. Der daraus resultierende inhibitorische Effekt war nicht additiv. Diese nicht additive Hemmung der DRA-Aktivität deutet an, dass Lipid Rafts und die PI3-Kinase denselben Trafficking-Pfad von DRA beeinflussen. An dieser Stelle ist wichtig, dass eine Inhibition der PI3-Kinase keinen Einfluss nimmt auf die Raft-Assoziation von DRA und eine Störung der Raft-Integrität die Kinaseaktivität der PI3-Kinase nicht hemmt. Nach Inhibition der PI3-Kinase kann EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus weiterhin in Fraktionen niedriger Dichte nach kalter Extraktion mit Triton-X100 und Sucrose-Gradienten-Zentrifugation nachgewiesen werden. Des Weiteren hat eine Cholesterindepletion und somit Störung der Raft-Integrität keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität der PI3-Kinase. Akt, ein Effektorprotein, liegt weiterhin phosphoryliert vor, obwohl die PI3-Kinase auch partiell in Rafts lokalisiert ist (Li et al., 2004).

Basierend auf diesen Daten kann ein Modell entwickelt werden, nach dem DRA in einem intrazellulären Kompartiment lokalisiert ist – zum Beispiel in recycling Endosomen oder im trans-Golgi-Netzwerk. Die Insertion aus diesem intrazellulären Kompartiment in die Plasmamembran benötigt intakte Lipid Rafts, eine aktive PI3-Kinase sowie die Interaktion mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen (siehe Abbildung 4.1). Eine Störung der Raft-Integrität oder Inhibition der PI3-Kinase hätte in diesem Modell eine Reduktion der Oberflächenexpression und Transportaktivität zur Folge.

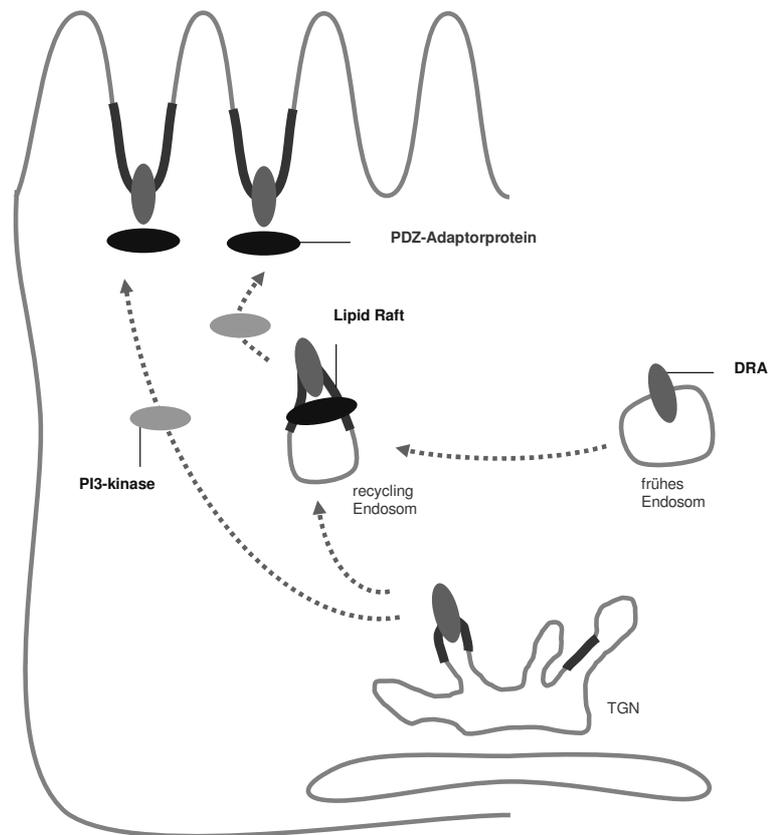


Abbildung 4.1: Modell exozytotischer Trafficking-Pfade von DRA

Die Insertion von DRA in die Plasmamembran benötigt intakte Lipid Rafts, die Interaktion mit PDZ-Adaptorproteinen und eine aktive PI3-Kinase.

Eine Störung der Raft-Integrität sowie die Inhibition der PI3-Kinase führt zu einer Reduktion der Plasmamembranexpression und Transportaktivität von DRA, nicht jedoch von DRA-ETKFminus. Möglicherweise ist die Endozytose von DRA unabhängig von PDZ-Adapterproteinen, das Recycling zurück zur Plasmamembran aber abhängig von der Interaktion von DRA mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen. Diese Vorstellung über die Rolle der PDZ-Adapterproteine im Trafficking von DRA stützt sich auf Erkenntnisse über das Recycling von anderen Membranproteinen. Die Internalisierung des Somatostatin-Rezeptors Subtyp 5 (SSTR5) ist PDZ-unabhängig, während das Recycling PDZ-abhängig ist. Nach Inkubation von HEK-Zellen, die SSTR5 bzw. eine Mutante, die das PDZ-Interaktionsmotiv fehlt, exprimieren, mit einem Agonisten konnten beide SSTR5-Formen in Golgi-Strukturen detektiert werden. Nach Entfernung des Agonisten wurde jedoch nur die Wildtyp-Form des SSTR5 in Abhängigkeit von NHERF3 und PIST (weiteres PDZ-Adapterprotein) recycelt (Wente et al., 2005). Swiatecka-Urban et al. zeigten, dass die Reinsertion von CFTR in die Plasmamembran abhängig ist von der Interaktion mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen, nicht aber der Ausbau aus der Plasmamembran

(Swiatecka-Urban et al., 2002). Interessanterweise findet sich eine Mutante des Thyrotropin-Rezeptors, die nicht mit PDZ-Adapterproteinen interagieren kann, nach der Rezeptorinternalisierung nicht im recycling Endosom sondern im späten Endosom, während der Wildtyp-Rezeptor sich im recycling Endosom befindet (Lahuna et al., 2005). In einer vorausgegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass NHERF2, NHERF3 und NHERF4 partiell in Rafts lokalisiert sind und dort mit DRA interagieren. Möglicherweise ist diese spezifische PDZ-Interaktion innerhalb der Rafts essentiell für die von der PI3-Kinase abhängige Insertion von DRA in die Plasmamembran.

Die Daten zeigen ein enges und bisher unbeachtetes Zusammenspiel zwischen PDZ-Interaktion, Lipid Raft-Assoziation, PI3-Kinase und der Aktivität sowie Plasmamembranexpression eines Transportproteins.

4.2 Lokalisation von DRA in unterschiedlichen Endosomen-Populationen

Die Insertion von DRA in die Plasmamembran ist ein von Rafts, PI3-Kinase und PDZ-Adapterproteinen abhängiger Schritt. Membranproteine gelangen auf zwei Wegen an die Plasmamembran: (A) Sekretorischer Weg vom trans-Golgi-Netzwerk über sekretorische Vesikel oder (B) Recycling-Weg über verschiedene Endosomen-Populationen (Glick and Nakano, 2009). Wie schon in Abschnitt 4.1 erwähnt spielen die PDZ-Adapterproteine eine wesentliche Rolle für das Recycling von Membranproteinen (CFTR, SSTR5, Thyrotropin-Rezeptor) (Lahuna et al., 2005; Swiatecka-Urban et al., 2002; Wente et al., 2005). Des Weiteren sind die PI3-Kinase und einige ihrer Lipidprodukte essentiell für den intrazellulären Vesikeltransport (Lindmo and Stenmark, 2006). So findet sich die PI3-Kinase und Phosphatidylinositol-3-Phosphat (Lipidprodukt der PI3-Kinase) assoziiert mit frühen Endosomen (Grant and Donaldson, 2009). Der Übergang von Aquaporin 2 (AQP2) von frühen Endosomen in recycling Endosomen ist von der PI3-Kinase abhängig. Eine Inhibition der PI3-Kinase mit LY294002 verhindert diesen Vesikeltransfer (Takata et al., 2004). In Bezug auf die elektroneutrale NaCl-Resorption führt eine Inhibition der PI3-Kinase zu einer Verminderung der Oberflächenexpression und zu einer Akkumulation von NHE3 in intrazellulären Kompartimenten (Kurashima et al., 1998). Um das Zusammenspiel von Lipid Rafts, PI3-Kinase und PDZ-Adapterproteinen in Bezug auf die Exozytose von DRA besser charakterisieren zu können, sollte der Recycling-Weg von DRA – vom frühen Endosom zum recycling Endosom bzw. späten Endosom – aufgeklärt werden.

Hierfür wurden HEK/EGFP-DRA und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus Zellen verwendet, um direkt den Einfluss des PDZ-Interaktionsmotivs zu bestimmen. Die durchgeführten Experimente zeigen Folgendes: (A) DRA und DRA-ETKFminus werden zu gleichen Anteilen an der Plasmamembran exprimiert. (B) Der lysosomale Abbau von DRA-ETKFminus erfolgt schneller als der lysosomale Abbau von DRA. (C) Die endosomale Verteilung von DRA ist abhängig von dessen PDZ-Interaktionsmotiv. Unabhängig vom PDZ-Interaktionsmotiv findet sich DRA in frühen Endosomen. DRA-ETKFminus findet sich kaum in recycling Endosomen, aber in späten Endosomen, während DRA überwiegend in recycling Endosomen lokalisiert ist. (D) Dominant negatives Rab11a (Rab11aS25N) hat eine Reduktion der Transportaktivität und Oberflächenexpression von DRA zur Folge.

Aus den Resultaten der Immunisolation und der Fluoreszenzmikroskopie geht hervor, dass für die endosomale Verteilung von DRA das PDZ-Interaktionsmotiv erforderlich ist. EGFP-DRA-ETKFminus, das nicht mit PDZ-Adapterproteinen interagieren kann, ist mit Rab7a-haltigen Vesikeln (späte Endosomen) assoziiert, während EGFP-DRA mit Rab11a-haltigen Vesikeln (recycling Endosomen) assoziiert ist. Gleiches zeigt sich für eine Mutante des Thyrotropin-Rezeptors, die nicht mit PDZ-Adapterproteinen interagieren kann. Diese findet sich nach der Rezeptorinternalisierung nicht im recycling Endosom sondern im späten Endosom, während der Wildtyp-Rezeptor sich im recycling Endosom befindet (Lahuna et al., 2005). Auch eine Mutation des PDZ-Interaktionsmotivs des Thrombozyten-Purinorezeptors P2Y₁₂ schwächt dessen Recycling und Resensibilisierung ab (Nisar et al., 2011). Des Weiteren interagiert NHERF1 mit dem zytoplasmatischen Ende des β 2-adrenergen Rezeptors sowie über die ERM-Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett. Eine Störung der PDZ-Interaktion bzw. eine Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts hat eine Fehlsortierung des β 2-adrenergen Rezeptors zur Folge (Cao et al., 1999). Lauffer et al. zeigten jedoch, dass ein NHERF1-Knockdown keine Fehlsortierung des Rezeptors zur Folge hat. Aber SNX27 (sorting nexin 27), ein weiteres PDZ-Adapterprotein, welches mit Phosphatidylinositol-3-Phosphat interagiert und somit mit frühen Endosomen assoziiert ist (Rincon et al., 2007), beeinflusst das Recycling des β 2-adrenergen Rezeptors. Ein SNX27-Knockdown führt zu einer Störung des Rezeptor-Recyclings (Lauffer et al., 2010).

Aus den Ergebnissen der Immunisolation und Fluoreszenzmikroskopie ergibt sich ein Modell, nach dem die Internalisierung von DRA unabhängig von dessen PDZ-Interaktionsmotiv erfolgt. Sowohl DRA und DRA-ETKFminus finden sich in frühen Endosomen (Rab5a-haltig). Der Sortierprozess vom frühen Endosom zum recycling Endosom (Rab11a-haltig) bzw. späten Endosom (Rab7a-haltig) ist abhängig von dem PDZ-Interaktionsmotiv und infolgedessen von der Interaktion mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen. Denn in Rab11a-haltigen Vesikeln findet sich hauptsächlich

Wildtyp-DRA, kein DRA-ETKFminus. Dieses findet sich zu größeren Anteilen in späten Endosomen (Rab7a-haltig) (siehe Abbildung 4.2).

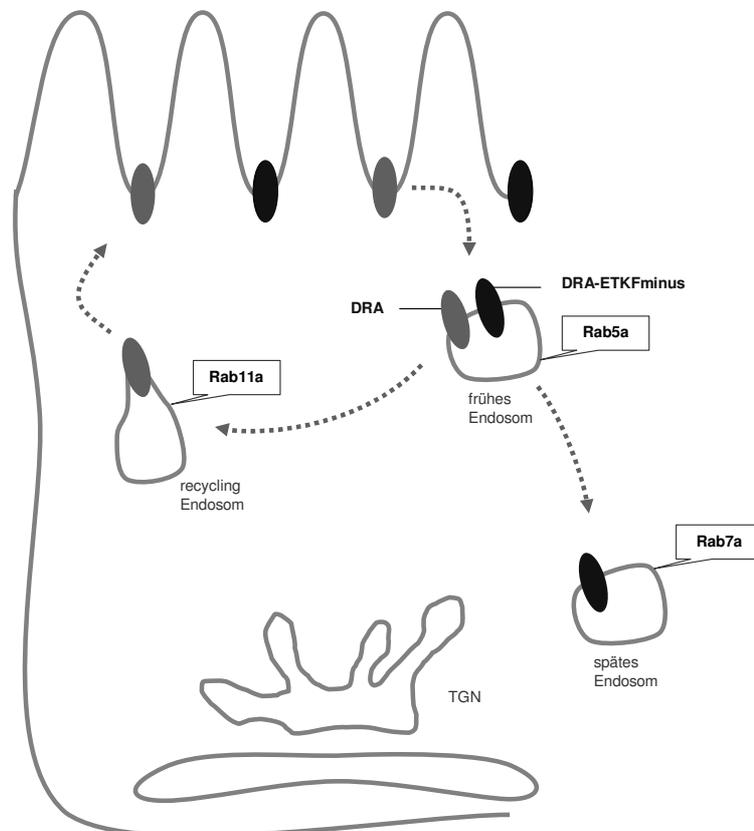


Abbildung 4.2: Modell der endosomalen Lokalisation von DRA

Die Lokalisation von DRA in den unterschiedlichen Endosomen-Populationen (frühes Endosom (Rab5a), spätes Endosom (Rab7a) und recycling Endosom (Rab11a)) ist abhängig von dem PDZ-Interaktionsmotiv. Das PDZ-Interaktionsmotiv schützt DRA vor dem lysosomalen Abbau und ist nötig für den Übergang aus frühen zu recycling Endosomen.

Nach diesem Modell führt eine Inhibition der Proteinbiosynthese zu einem schnelleren lysosomalen Abbau von DRA-ETKFminus und eine Störung des Recycling-Weges von DRA über Rab11-haltige Vesikel zu einer Reduktion der Oberflächenexpression und Transportaktivität von DRA. Nach Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid waren nach 5 Stunden noch $56 \pm 9\%$ DRA und nur noch $36 \pm 18\%$ DRA-ETKFminus vorhanden. Eine Überexpression eines dominant negativen Rab11a führte zu einer Verminderung des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch sowie zu einer Reduktion der Oberflächenexpression. Diese Ergebnisse bestätigen, dass das PDZ-Interaktionsmotiv von DRA entscheidend ist für dessen Recycling über Rab11a-haltige Endosomen zurück zur Plasmamembran. Andere Arbeitsgruppen (Karpushev et al., 2008; Silvis et al., 2009) zeigten, dass auch der Na^+ -Kanal EnaC sowie der Cl^- -Kanal CFTR Rab11 abhängig recycelt werden. Rab11a ist co-lokalisiert mit ENaC und erhöht dessen Transportleistung. Brefeldin A, ein Inhibitor der intrazellulären Proteintranslokation, blockiert den

stimulatorischen Effekt von Rab11a auf die ENaC-Aktivität (Karpushev et al., 2008). Silvis et al. deckten auf, dass CFTR in Rab11a- sowie Rab11b-haltigen recycling Endosomen vorkommt. Interessanterweise resultiert aus einer Transfektion von T84-Zellen mit dominant negativem Rab11b (Rab11bS25N) eine 70%ige Inhibition des durch Forskolin stimulierten Cl⁻-Transportes sowie eine 50%ige Reduktion der Oberflächenexpression von CFTR, während dominant negatives Rab11a keinen Einfluss hat (Silvis et al., 2009). Jedoch zeigte Silvis auch, dass Rab11a wahrscheinlich essentiell für die Regulation des *steady state* des apikal exprimierten CFTR ist. Denn aus einer Transfektion von T84-Zellen mit dominant negativen Rab11a (Rab11aS25N) resultiert eine Reduktion der Plasmamembranexpression und Transportaktivität von CFTR in Abwesenheit der Forskolin- bzw. cAMP/PKA-Stimulation. Diese Daten suggerieren, dass Rab11a nötig ist für den Erhalt bzw. die Regulation des an der Plasmamembran exprimierten CFTR in Abwesenheit von Agonisten. Dies könnte als Paradigma für DRA gelten. Die durchgeführten Experimente erfolgten unter basalen Bedingungen ohne extrazelluläre Stimuli.

Borthakur et al. zeigten, dass das Probiotikum *Lactobacillus acidophilus* die Transportaktivität und Oberflächenexpression von DRA in Abhängigkeit von der PI3-Kinase erhöht (Borthakur et al., 2008). Des Weiteren zeigten Singla et al., dass LPA über die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges die DRA-Aktivität steigert (Singla et al., 2010). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die PI3-Kinase neben intakten Lipid Rafts und der PDZ-Interaktion notwendig ist für die Exozytose von DRA. Im Zusammenhang mit der intestinalen NaCl-Resorption wird auch NHE3 in Abhängigkeit von der PI3-Kinase reguliert. Eine Inkubation von NHE3 stabil transfizierten PS120-Zellen mit einem synthetischen Aktivator der PI3-Kinase (Rhodamin- β -Ala-QRLFQVKGRR) oder Transfektion mit einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase führt zu einem gesteigerten Na⁺/H⁺-Austausch vermittelt durch NHE3 (Lee-Kwon et al., 2001). Interessanterweise hat eine gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und eine Störung der Raft-Integrität keinen additiven inhibitorischen Effekt auf die NHE3-Aktivität (Murtazina et al., 2006); entsprechendes gilt für die DRA-Aktivität. Eine Inhibition der PI3-Kinase führt zu einer Akkumulation von NHE3 in endosomalen Strukturen und zu einer daraus resultierenden Abnahme der Oberflächenexpression (Kurashima et al., 1998). Inhibitoren der PI3-Kinase, wie Wortmannin oder LY294002, verhindern die Fusion von endosomalen Strukturen mit der Plasmamembran (Shepherd et al., 1995). Beispiel hierfür sind die durch Insulin stimulierte Exozytose von Glucose-Transporter tragenden Vesikeln (Cormont and Marchand-Brustel, 2001) oder die Sekretion von Granula von Neutrophilen (Sue et al., 1997). Eine konstitutive aktive PI3-Kinase stimuliert die endosomale Fusion von Vesikeln, während bei einer Mutante, der die Kinasedomäne fehlt, die Fusion fehlschlägt (Li et al., 1995). Der Übergang von Aquaporin 2

(AQP2) von frühen Endosomen zu recycling Endosomen reagiert sensitiv auf Wortmannin und LY294002 und ist somit abhängig von der PI3-Kinase (Takata et al., 2004). Gleichzeitig hat LY294002 keine inhibitorische Wirkung auf den stimulatorischen Effekt von Rab11a auf die ENaC-Aktivität (Karpushev et al., 2008). Für DRA muss in weiteren Experimenten geklärt werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dessen Rab11a abhängigem Recycling und der PI3-Kinase.

Interessanterweise sind recycling Endosomen reich an Raft-Lipiden wie z.B. Sphingomyelin und Cholesterin, während späte Endosomen nur geringe Mengen dieser Lipide aufweisen (Gagescu et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass dieses spezifische Vorhandensein von Lipid Raft Komponenten in recycling Endosomen mit entscheidend ist für die Regulation der Protein- und Lipid-Sortierung und -Trafficking. Eine Störung der Raft-Integrität hat einen veränderten „Turnover“ des K⁺-Kanals Kv1.5 zur Folge. Nach Transfektion von AAM-Zellen, die stabil hKv1.5-EGFP exprimieren, mit dominant negativem Rab11 hat eine Störung der Raft-Integrität keinen Einfluss mehr auf das „Turnover“ des K⁺-Kanals (Balse et al., 2009). Für DRA muss in weiteren Experimenten geklärt werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dessen Raft-Assoziation und dessen Rab11a abhängigem Recycling.

Da die Oberflächenexpression sowie die Transportaktivität von DRA und DRA-ETKFminus keine Unterschiede zeigen, obwohl DRA-ETKFminus schneller proteolytisch degradiert wird, muss DRA-ETKFminus unabhängig von PDZ-Interaktion, Lipid Raft, PI3-Kinase und Rab11a in die Plasmamembran eingebaut werden. An dieser Stelle muss beachtet werden, dass mit EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus überexprimierenden Zellen gearbeitet wurde. Des Weiteren besteht neben dem Rab11 abhängigen Recycling-Weg ein weiterer Recycling- Weg über Rab4-positive Vesikel zur Verfügung (Grant and Donaldson, 2009). In wieweit dieser Recycling-Weg eine Rolle spielt für die Regulation des durch DRA vermittelten Cl⁻/HCO₃⁻-Austausches muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Neben dem Recycling von Membranproteinen ist auch der klassische Weg von ER über Golgi und TGN für den Erhalt der Membranproteine in der Plasmamembran von Bedeutung. Im TGN werden die Proteine in apikale Transportvesikel sortiert, die direkt mit der Plasmamembran verschmelzen können oder auch wieder in endosomalen Kompartimenten enden (Grant and Donaldson, 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein enges Zusammenspiel zwischen PDZ-Interaktion, Lipid Raft-Assoziation, PI3-Kinase und der Aktivität sowie Plasmamembranexpression von DRA besteht und dass die endosomale Verteilung von DRA abhängig ist von einer möglichen PDZ-Interaktion.

4.3 Möglichkeiten und Grenzen der Immunisolation

Mit Hilfe der Immunisolation können Zellorganellen aus einem Zellhomogenat spezifisch isoliert werden mittels Antikörpern. Diese Methodik erlaubt es Zellorganellen mit sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften (Größe und Dichte) auf der Basis der Expression eines bestimmten Markerproteins zu isolieren (Trischler et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden mit dieser Methode Endosomen isoliert. Allerdings wurde das Experiment von verschiedenen äußeren Faktoren beeinflusst und dadurch störanfällig. Die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen Rab5, Rab7 und Rab11 waren leider nicht für die Immunisolation geeignet. Deshalb mussten HEK/EGFP-DRA und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus Zellen generiert werden, die stabil mCherry-HA-Rab5a, -Rab7a bzw. -Rab11a exprimieren. Dies ermöglichte schließlich die Immunisolation mittels anti-HA-gekoppelter Agarose. Quencheffekte von cytosolischen RabGTPasen würden die Immunisolation ineffektiv werden lassen. Um dies zu vermeiden, musste ein mit Endosomen angereichertes Ausgangsmaterial mittels Sucrose-Gradienten-Zentrifugation präpariert werden. Erst dieses Ausgangsmaterial konnte für die Isolation der Endosomen genutzt werden. Ein Aufbrechen der Zellkerne während der Homogenisation führt zu einem Verkleben der Zellorganellen durch freiwerdende DNA. Diese gebildeten Organellenkomplexe flottieren im Sucrose-Gradienten in Fraktionen hoher Dichte und nicht in Fraktionen ihrer Dichte entsprechend. Auf Grund dieser Gefahr erfolgte eine mäßige Homogenisation der Zellen, so dass nur ca. 40-60% der Zellen aufgebrochen wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass Proteine unspezifisch an die Agarose binden und ein falsch-positives Ergebnis erzeugen. Um dies zu vermeiden wurde die Immunisolation testweise mit Anti-HA-gekoppelter Agarose und Anti-mCherry-gekoppelter Sepharose durchgeführt. Erste Versuche zeigten, dass die Immunisolation mit Anti-mCherry-gekoppelter Sepharose falsch-positive Ergebnisse erzeugte, da RabGTPasen unspezifisch präzipitiert wurden.

Auf Grund der genannten Faktoren, die trotz der genannten Maßnahmen im Einzelfall nicht zu kontrollieren waren und in ihrer Summe nachhaltig sein konnten, wurden nur Experimente in die Auswertung einbezogen, in den die Wiederauffindungsrate des Markerproteins (RabGTPasen) und des untersuchten Proteins (EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus) zwischen 85 und 115% lag.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die elektroneutrale NaCl-Resorption im Intestinaltrakt erfolgt durch parallelen Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt durch die Transportproteine NHE3 und DRA. Knockout-Mäuse, die an chronischer Diarrhöe leiden, sowie die Kongenitale Chlorid Diarrhöe, bei der ein nicht funktionelles DRA eine lebenslange Diarrhöe hervorruft, heben die Wichtigkeit dieser beiden Transportproteine hervor. Um diese fehlerhafte NaCl-Resorption aufzuklären, müssen die physiologische Regulation beider Transportproteine sowie die verantwortlichen extra- und intrazellulären Signaltransduktionswege aufgedeckt werden. Beide Transportproteine interagieren mit PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie. Beide Ionenaustauscher sind partiell in Rafts lokalisiert. Eine Störung der Raft-Integrität hat eine verminderte Transportaktivität von NHE3 zur Folge. Des Weiteren ist der Einbau von NHE3 in die Plasmamembran abhängig von dessen partieller Raft-Assoziation und der PI3-Kinase. Auf Grund der funktionellen Kopplung von NHE3 und DRA können die Erkenntnisse zur Raft-Assoziation und zum Einfluss der PI3-Kinase auf die Exozytose von NHE3 als Paradigma für DRA gelten. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welche Rolle die partielle Raft-Assoziation von DRA für dessen Plasmamembranexpression und Transportaktivität spielt sowie welchen Einfluss die PI3-Kinase hat. Es konnte Folgendes gezeigt werden: (A) Eine Störung der Raft-Integrität führt zu einer Reduktion des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches. In HEK-Zellen war die Inhibition der Transportaktivität abhängig von dem Vorhandensein des PDZ-Interaktionsmotivs. In Caco-2/BBE-Zellen war hingegen die Inhibition des durch DRA vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches nur teilweise abhängig von der PDZ-Interaktion. (B) Eine Störung der Raft-Integrität hat eine Reduktion der Oberflächenexpression von DRA zur Folge, nicht jedoch von DRA-ETKFminus, einer Mutante, die das PDZ-Interaktionsmotiv fehlt. (C) Die basale Transportaktivität sowie Oberflächenexpression von DRA wird gesteuert von der PI3-Kinase in Abhängigkeit vom PDZ-Interaktionsmotiv. (D) Lipid Rafts und die PI3-Kinase beeinflussen denselben Trafficking-Pfad von DRA, wobei eine Inhibition der PI3-Kinase keinen Einfluss auf die Raft-Assoziation von DRA hat und eine Störung der Raft-Integrität die Kinaseaktivität der PI3-Kinase hingegen nicht hemmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Insertion von DRA in die Plasmamembran intakte Lipid Rafts, eine aktive PI3-Kinase sowie die Interaktion mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen erfordert. Um das Zusammenspiel von Lipid Rafts, PI3-Kinase und

PDZ-Adapterproteinen in Bezug auf die Exozytose von DRA besser charakterisieren zu können, wurde der Recycling-Weg von DRA – vom frühen Endosom zum recycling Endosom bzw. späten Endosom – untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der lysosomale Abbau von DRA-ETKFminus schneller als der lysosomale Abbau von DRA erfolgt, obwohl DRA und DRA-ETKFminus zu gleichen Anteilen an der Plasmamembran exprimiert werden. Auch wurde gefunden, dass die endosomale Verteilung von DRA abhängig von dessen PDZ-Interaktionsmotiv ist. In recycling Endosomen findet sich hauptsächlich Wildtyp-DRA, aber kein DRA-ETKFminus. Dieses findet sich dafür zu größeren Anteilen in späten Endosomen (C) Darüberhinaus zeigte sich, dass dominant negatives Rab11a (Rab11aS25N) eine Reduktion der Transportaktivität und Oberflächenexpression von DRA zur Folge hat. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit somit gezeigt werden, dass ein enges Zusammenspiel zwischen PDZ-Interaktion, Lipid Raft-Assoziation, PI3-Kinase und der Transportaktivität sowie Plasmamembranexpression von DRA besteht. Die endosomale Verteilung von DRA ist abhängig von dessen PDZ-Interaktionsmotiv und DRA gelangt über Rab11a-haltige recycling Endosomen zur Plasmamembran.

6 SUMMARY

Electroneutral NaCl absorption occurs from the small intestine to the distal colon. This ion exchange is preferentially mediated by DRA and NHE3. Knockout mice, which suffer from chronic diarrhea, as well as the human genetic disorder congenital chloride diarrhea, in which a nonfunctional DRA leads to life-threatening diarrhea emphasize the importance of these two transporters. To elucidate this defective NaCl absorption it is necessary to understand the physiological regulation of these two transport proteins within enterocytes as well as the responsible extra- and intracellular signal transduction pathways. Both transport proteins interact with PDZ adaptor proteins of the NHERF family. Furthermore, both exchangers are partially localized within lipid rafts. The situation for NHE3 is complex in that its lipid raft localization is not only necessary for its normal activity but also for its basal and stimulated trafficking. Lipid rafts are involved in PI3-kinase dependent exocytosis of NHE3. Since the function of NHE3 and DRA appears to be regulated in parallel the function of DRA maybe depends on its rafts association as well. Thus the first objective of this thesis was to investigate whether the lipid raft association of DRA is essential for the surface expression and transport activity of DRA and also to analyze whether DRA is inserted into the plasma membrane in a PI3-kinase and lipid raft dependent manner. The present data show that: (A) Disruption of lipid raft integrity leads to functional inhibition and decreased cell surface expression of DRA. In HEK cells the inhibition of DRA activity as well as the decreased cell surface expression are entirely dependent on the presence of the PDZ interaction motif of DRA. In Caco-2/BBE cells on the other hand only part of the inhibition of DRA activity by disruption of raft integrity depends on the ability of DRA to interact with PDZ adaptor proteins. (B) Basal activity as well as basal surface expression of DRA depend on PI3-kinase activity in a way that requires the ability of DRA to interact with PDZ adaptor proteins. (C) Lipid rafts and PI3-kinase are situated along the same pathway, where DRA is present in lipid rafts before it is inserted into the plasma membrane. However, the inhibition of PI3-kinase has no influence on the raft association of DRA. Furthermore, the disruption of raft integrity does not inhibit the PI3-kinase activity. Based on these findings a model can be established as follows: DRA is present in lipid rafts in an intracellular fraction. Insertion into the plasma membrane from this intracellular compartment requires the interaction with one (or several) PDZ adaptor proteins, raft integrity and the action of PI3-kinase. To characterize the interplay between PI3-kinase, raft

association and PDZ interaction of DRA with its insertion into the plasma membrane the recycling pathway of DRA was then investigated. The generated data show that the proteolytic degradation of DRA-ETKF_{minus} occurs faster than the degradation of wild type DRA. Endosomal distribution of DRA depends on its PDZ-binding motif. The sorting process from early to recycling endosomes depends on the interaction of DRA with one or several PDZ adaptor proteins. Expression of dominant negative Rab11a leads to a decreased surface expression and transport activity of DRA. In conclusion, it was shown in this thesis that an intense interplay between PDZ interaction, lipid raft association, PI3-kinase and the activity and surface expression of DRA exists. It was also shown that the endosomal distribution of DRA depends on its PDZ-binding motif. Finally, it was demonstrated that DRA is recycled to the plasma membrane by Rab11a-enriched recycling endosomes.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aiston,S., Hampson,L.J., Arden,C., Iynedjian,P.B., and Agius,L. (2006). The role of protein kinase B/Akt in insulin-induced inactivation of phosphorylase in rat hepatocytes. *Diabetologia* 49, 174-182.

Alonso,M.A. and Millan,J. (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 114, 3957-3965.

Alper,S.L., Rossmann,H., Wilhelm,S., Stuart-Tilley,A.K., Shmukler,B.E., and Seidler,U. (1999). Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am. J. Physiol* 277, G321-G332.

Aronson,P.S. (2006). Ion exchangers mediating Na⁺, *H. J. Nephrol.* 19 *Suppl* 9, S3-S10.

Bachmann,O., Riederer,B., Rossmann,H., Groos,S., Schultheis,P.J., Shull,G.E., Gregor,M., Manns,M.P., and Seidler,U. (2004). The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 is the predominant NHE isoform in murine colonic crypts and its lack causes NHE3 upregulation. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 287, G125-G133.

Balse,E., El Haou,S., Dillanian,G., Dauphin,A., Eldstrom,J., Fedida,D., Coulombe,A., and Hatem,S.N. (2009). Cholesterol modulates the recruitment of Kv1.5 channels from Rab11-associated recycling endosome in native atrial myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 14681-14686.

Bezzarides,V.J., Ramsey,I.S., Kotecha,S., Greka,A., and Clapham,D.E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell Biol.* 6, 709-720.

Boll,M., Daniel,H., and Gasnier,B. (2004). The SLC36 family: proton-coupled transporters for the absorption of selected amino acids from extracellular and intracellular proteolysis. *Pflugers Arch.* 447, 776-779.

Borthakur,A., Gill,R.K., Tyagi,S., Koutsouris,A., Alrefai,W.A., Hecht,G.A., Ramaswamy,K., and Dudeja,P.K. (2008). The probiotic *Lactobacillus acidophilus* stimulates

chloride/hydroxyl exchange activity in human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* *138*, 1355-1359.

Brett,C.L., Donowitz,M., and Rao,R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol Cell Physiol* *288*, C223-C239.

Brown,D.A. and Rose,J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* *68*, 533-544.

Byeon,M.K., Westerman,M.A., Maroulakou,I.G., Henderson,K.W., Suster,S., Zhang,X.K., Papas,T.S., Vesely,J., Willingham,M.C., Green,J.E., and Schweinfest,C.W. (1996). The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene* *12*, 387-396.

Canessa,C.M., Schild,L., Buell,G., Thorens,B., Gautschi,I., Horisberger,J.D., and Rossier,B.C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* *367*, 463-467.

Cao,T.T., Deacon,H.W., Reczek,D., Bretscher,A., and von Zastrow,M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* *401*, 286-290.

Casey,P.J. (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science* *268*, 221-225.

Cha,B., Kim,J.H., Hut,H., Hogema,B.M., Nadarja,J., Zizak,M., Cavet,M., Lee-Kwon,W., Lohmann,S.M., Smolenski,A., Tse,C.M., Yun,C., de Jonge,H.R., and Donowitz,M. (2005). cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. *J. Biol. Chem.* *280*, 16642-16650.

Choi,J.W., Lee-Kwon,W., Jeon,E.S., Kang,Y.J., Kawano,K., Kim,H.S., Suh,P.G., Donowitz,M., and Kim,J.H. (2004). Lysophosphatidic acid induces exocytic trafficking of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 3 by E3KARP-dependent activation of phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* *1683*, 59-68.

Cinar,A., Chen,M., Riederer,B., Bachmann,O., Wiemann,M., Manns,M., Kocher,O., and Seidler,U. (2007). NHE3 inhibition by cAMP and Ca²⁺ is abolished in PDZ-domain protein PDZK1-deficient murine enterocytes. *J. Physiol* *581*, 1235-1246.

Cormont,M. and Marchand-Brustel,Y. (2001). The role of small G-proteins in the regulation of glucose transport (review). *Mol. Membr. Biol.* *18*, 213-220.

- Custer,M., Spindler,B., Verrey,F., Murer,H., and Biber,J. (1997). Identification of a new gene product (diphor-1) regulated by dietary phosphate. *Am. J. Physiol* 273, F801-F806.
- Deliot,N., Hernando,N., Horst-Liu,Z., Gisler,S.M., Capuano,P., Wagner,C.A., Bacic,D., O'Brien,S., Biber,J., and Murer,H. (2005). Parathyroid hormone treatment induces dissociation of type IIa Na⁺-P(i) cotransporter-Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 complexes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 289, C159-C167.
- Donowitz,M. and Li,X. (2007). Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev.* 87, 825-872.
- Dudez,T., Borot,F., Huang,S., Kwak,B.R., Bacchetta,M., Ollero,M., Stanton,B.A., and Chanson,M. (2008). CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 779-788.
- Field,M. (2003). Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest* 111, 931-943.
- Gagescu,R., Demaurex,N., Parton,R.G., Hunziker,W., Huber,L.A., and Gruenberg,J. (2000). The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol. Biol. Cell* 11, 2775-2791.
- Gawenis,L.R., Hut,H., Bot,A.G., Shull,G.E., de Jonge,H.R., Stien,X., Miller,M.L., and Clarke,L.L. (2004). Electroneutral sodium absorption and electrogenic anion secretion across murine small intestine are regulated in parallel. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 287, G1140-G1149.
- Giannella,R.A. and Mann,E.A. (2003). E. coli heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 114, 67-85.
- Glick,B.S. and Nakano,A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 113-132.
- Grant,B.D. and Donaldson,J.G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597-608.
- Haila,S., Saarialho-Kere,U., Karjalainen-Lindsberg,M.L., Lohi,H., Airola,K., Holmberg,C., Hastbacka,J., Kere,J., and Hoglund,P. (2000). The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem. Cell Biol.* 113, 279-286.

- Hall,R.A., Spurney,R.F., Premont,R.T., Rahman,N., Blitzler,J.T., Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1999). G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction. *J. Biol. Chem.* 274, 24328-24334.
- Harris,B.Z. and Lim,W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114, 3219-3231.
- He,J., Lau,A.G., Yaffe,M.B., and Hall,R.A. (2001). Phosphorylation and cell cycle-dependent regulation of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 by Cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 41559-41565.
- Hoglund,P., Haila,S., Gustavson,K.H., Taipale,M., Hannula,K., Popinska,K., Holmberg,C., Socha,J., de la,C.A., and Kere,J. (1998). Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum. Mutat.* 11, 321-327.
- Hoglund,P., Haila,S., Scherer,S.W., Tsui,L.C., Green,E.D., Weissenbach,J., Holmberg,C., de la,C.A., and Kere,J. (1996a). Positional candidate genes for congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res.* 6, 202-210.
- Hoglund,P., Haila,S., Socha,J., Tomaszewski,L., Saarialho-Kere,U., Karjalainen-Lindsberg,M.L., Airola,K., Holmberg,C., de la,C.A., and Kere,J. (1996b). Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat. Genet.* 14, 316-319.
- Holmberg,C., Perheentupa,J., and Launiala,K. (1975). Colonic electrolyte transport in health and in congenital chloride diarrhea. *J. Clin. Invest* 56, 302-310.
- Hoogerwerf,W.A., Tsao,S.C., Devuyst,O., Levine,S.A., Yun,C.H., Yip,J.W., Cohen,M.E., Wilson,P.D., Lazenby,A.J., Tse,C.M., and Donowitz,M. (1996). NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am. J. Physiol* 270, G29-G41.
- Hung,A.Y. and Sheng,M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 5699-5702.
- Ilangumaran,S. and Hoessli,D.C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335 (Pt 2), 433-440.

- Ishikura,S., Koshkina,A., and Klip,A. (2008). Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 61-74.
- Itoh,K., Sakakibara,M., Yamasaki,S., Takeuchi,A., Arase,H., Miyazaki,M., Nakajima,N., Okada,M., and Saito,T. (2002). Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J. Immunol.* 168, 541-544.
- Ivanov,A.I. (2008). Exocytosis and endocytosis. Preface. *Methods Mol. Biol.* 440, v-vi.
- Jacob,P., Rossmann,H., Lamprecht,G., Kretz,A., Neff,C., Lin-Wu,E., Gregor,M., Groneberg,D.A., Kere,J., and Seidler,U. (2002). Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻. *Gastroenterology* 122, 709-724.
- Jones,M.C., Caswell,P.T., and Norman,J.C. (2006). Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 549-557.
- Karpushev,A.V., Levchenko,V., Pavlov,T.S., Lam,V.Y., Vinnakota,K.C., Vandewalle,A., Wakatsuki,T., and Staruschenko,A. (2008). Regulation of ENaC expression at the cell surface by Rab11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 521-525.
- Kato,A. and Romero,M.F. (2011). Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. *Annu. Rev. Physiol* 73, 261-281.
- Kim,J.H., Lee-Kwon,W., Park,J.B., Ryu,S.H., Yun,C.H., and Donowitz,M. (2002). Ca⁽²⁺⁾-dependent inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP- α -actinin-4 complex for oligomerization and endocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 23714-23724.
- Knickelbein,R., Aronson,P.S., Atherton,W., and Dobbins,J.W. (1983). Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am. J. Physiol* 245, G504-G510.
- Knickelbein,R., Aronson,P.S., Schron,C.M., Seifter,J., and Dobbins,J.W. (1985). Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling. *Am. J. Physiol* 249, G236-G245.
- Ko,S.B., Shcheynikov,N., Choi,J.Y., Luo,X., Ishibashi,K., Thomas,P.J., Kim,J.Y., Kim,K.H., Lee,M.G., Naruse,S., and Muallem,S. (2002). A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁽⁻⁾ transport in cystic fibrosis. *EMBO J.* 21, 5662-5672.

Ko,S.B., Zeng,W., Dorwart,M.R., Luo,X., Kim,K.H., Millen,L., Goto,H., Naruse,S., Soyombo,A., Thomas,P.J., and Muallem,S. (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat. Cell Biol.* 6, 343-350.

Kocher,O., Pal,R., Roberts,M., Cirovic,C., and Gilchrist,A. (2003a). Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination. *Mol. Cell Biol.* 23, 1175-1180.

Kocher,O., Yesilaltay,A., Cirovic,C., Pal,R., Rigotti,A., and Krieger,M. (2003b). Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 52820-52825.

Kowalski,M.P. and Pier,G.B. (2004). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J. Immunol.* 172, 418-425.

Kundu,A., Avalos,R.T., Sanderson,C.M., and Nayak,D.P. (1996). Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.* 70, 6508-6515.

Kurashima,K., D'Souza,S., Szaszi,K., Ramjeesingh,R., Orlowski,J., and Grinstein,S. (1999). The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274, 29843-29849.

Kurashima,K., Szabo,E.Z., Lukacs,G., Orlowski,J., and Grinstein,S. (1998). Endosomal recycling of the Na+/H+ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 20828-20836.

Lahuna,O., Quellari,M., Achard,C., Nola,S., Meduri,G., Navarro,C., Vitale,N., Borg,J.P., and Misrahi,M. (2005). Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-betaPIX-GIT1-ARF6 pathway. *EMBO J.* 24, 1364-1374.

Lamprecht,G., Baisch,S., Schoenleber,E., and Gregor,M. (2005). Transport properties of the human intestinal anion exchanger DRA (down-regulated in adenoma) in transfected HEK293 cells. *Pflugers Arch.* 449, 479-490.

Lamprecht,G., Heil,A., Baisch,S., Lin-Wu,E., Yun,C.C., Kalbacher,H., Gregor,M., and Seidler,U. (2002). The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl⁻. *Biochemistry* 41, 12336-12342.

- Lamprecht,G., Hsieh,C.J., Lissner,S., Nold,L., Heil,A., Gaco,V., Schaefer,J., Turner,J.R., and Gregor,M. (2009). Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium. *J. Biol. Chem.* *284*, 19744-19753.
- Lamprecht,G., Schaefer,J., Dietz,K., and Gregor,M. (2006). Chloride and bicarbonate have similar affinities to the intestinal anion exchanger DRA (down regulated in adenoma). *Pflugers Arch.* *452*, 307-315.
- Lamprecht,G. and Seidler,U. (2006). The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* *291*, G766-G777.
- Lamprecht,G., Weinman,E.J., and Yun,C.H. (1998). The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J. Biol. Chem.* *273*, 29972-29978.
- Lau,A.G. and Hall,R.A. (2001). Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry* *40*, 8572-8580.
- Lauffer,B.E., Melero,C., Temkin,P., Lei,C., Hong,W., Kortemme,T., and von Zastrow,M. (2010). SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* *190*, 565-574.
- Lee,M.G., Choi,J.Y., Luo,X., Strickland,E., Thomas,P.J., and Muallem,S. (1999a). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻. *J. Biol. Chem.* *274*, 14670-14677.
- Lee,M.G., Wigley,W.C., Zeng,W., Noel,L.E., Marino,C.R., Thomas,P.J., and Muallem,S. (1999b). Regulation of Cl⁻. *J. Biol. Chem.* *274*, 3414-3421.
- Lee-Kwon,W., Johns,D.C., Cha,B., Cavet,M., Park,J., Tsihchlis,P., and Donowitz,M. (2001). Constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase and AKT are sufficient to stimulate the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger 3. *J. Biol. Chem.* *276*, 31296-31304.
- Lee-Kwon,W., Kim,J.H., Choi,J.W., Kawano,K., Cha,B., Dartt,D.A., Zoukhri,D., and Donowitz,M. (2003). Ca²⁺-dependent inhibition of NHE3 requires PKC alpha which binds to E3KARP to decrease surface NHE3 containing plasma membrane complexes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* *285*, C1527-C1536.

- Li,G., D'Souza-Schorey,C., Barbieri,M.A., Roberts,R.L., Klippel,A., Williams,L.T., and Stahl,P.D. (1995). Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10207-10211.
- Li,X., Galli,T., Leu,S., Wade,J.B., Weinman,E.J., Leung,G., Cheong,A., Louvard,D., and Donowitz,M. (2001). Na⁺-H⁺ exchanger 3 (NHE3) is present in lipid rafts in the rabbit ileal brush border: a role for rafts in trafficking and rapid stimulation of NHE3. *J. Physiol* 537, 537-552.
- Li,X., Leu,S., Cheong,A., Zhang,H., Baibakov,B., Shih,C., Birnbaum,M.J., and Donowitz,M. (2004). Akt2, phosphatidylinositol 3-kinase, and PTEN are in lipid rafts of intestinal cells: role in absorption and differentiation. *Gastroenterology* 126, 122-135.
- Lindmo,K. and Stenmark,H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J. Cell Sci.* 119, 605-614.
- Magnani,F., Tate,C.G., Wynne,S., Williams,C., and Haase,J. (2004). Partitioning of the serotonin transporter into lipid microdomains modulates transport of serotonin. *J. Biol. Chem.* 279, 38770-38778.
- Mayor,S. and Maxfield,F.R. (1995). Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol. Biol. Cell* 6, 929-944.
- Melvin,J.E., Park,K., Richardson,L., Schultheis,P.J., and Shull,G.E. (1999). Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *J. Biol. Chem.* 274, 22855-22861.
- Mohrmann,K. and van der,S.P. (1999). Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol. Membr. Biol.* 16, 81-87.
- Murtazina,R., Kovbasnjuk,O., Chen,T.E., Zachos,N.C., Chen,Y., Kocinsky,H.S., Hogema,B.M., Seidler,U., de Jonge,H.R., and Donowitz,M. (2011). NHERF2 is necessary for basal activity, second messenger inhibition, and LPA stimulation of NHE3 in mouse distal ileum. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 301, C126-C136.
- Murtazina,R., Kovbasnjuk,O., Donowitz,M., and Li,X. (2006). Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity and trafficking are lipid Raft-dependent. *J. Biol. Chem.* 281, 17845-17855.
- Musch,M.W., Arvans,D.L., Wu,G.D., and Chang,E.B. (2009). Functional coupling of the downregulated in adenoma Cl⁻/base exchanger DRA and the apical Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 296, G202-G210.

- Nakamura,T., Shibata,N., Nishimoto-Shibata,T., Feng,D., Ikemoto,M., Motojima,K., Iso,O., Tsukamoto,K., Tsujimoto,M., and Arai,H. (2005). Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 13404-13409.
- Nguyen,H.T., Charrier-Hisamuddin,L., Dalmasso,G., Hiol,A., Sitaraman,S., and Merlin,D. (2007). Association of PepT1 with lipid rafts differently modulates its transport activity in polarized and nonpolarized cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 293, G1155-G1165.
- Nisar,S., Daly,M.E., Federici,A.B., Artoni,A., Mumford,A.D., Watson,S.P., and Mundell,S.J. (2011). An intact PDZ-motif is essential for correct P2Y12 purinoceptor traffic in human platelets. *Blood*.
- Nourry,C., Grant,S.G., and Borg,J.P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play! *Sci. STKE*. 2003, RE7.
- Orlowski,J. and Grinstein,S. (1997). Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 22373-22376.
- Orlowski,J. and Grinstein,S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 447, 549-565.
- Ory,S. and Gasman,S. (2011). Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links? *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 27-32.
- Raheja,G., Singh,V., Ma,K., Boumendjel,R., Borthakur,A., Gill,R.K., Saksena,S., Alrefai,W.A., Ramaswamy,K., and Dudeja,P.K. (2010). *Lactobacillus acidophilus* stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 298, G395-G401.
- Rajendran,L., Le Lay,S., and Illges,H. (2007). Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin. *Biol. Chem.* 388, 307-314.
- Rak,A., Pylypenko,O., Niculae,A., Goody,R.S., and Alexandrov,K. (2003). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of monoprenylated Rab7 GTPase in complex with Rab escort protein 1. *J. Struct. Biol.* 141, 93-95.
- Ridley,A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16, 522-529.

- Rietveld,A. and Simons,K. (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 467-479.
- Rincon,E., Santos,T., Avila-Flores,A., Albar,J.P., Lalioti,V., Lei,C., Hong,W., and Merida,I. (2007). Proteomics identification of sorting nexin 27 as a diacylglycerol kinase zeta-associated protein: new diacylglycerol kinase roles in endocytic recycling. *Mol. Cell Proteomics*. 6, 1073-1087.
- Riordan,J.R., Rommens,J.M., Kerem,B., Alon,N., Rozmahel,R., Grzelczak,Z., Zielenski,J., Lok,S., Plavsic,N., Chou,J.L., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- Rossmann,H., Jacob,P., Baisch,S., Hassoun,R., Meier,J., Natour,D., Yahya,K., Yun,C., Biber,J., Lackner,K.J., Fiehn,W., Gregor,M., Seidler,U., and Lamprecht,G. (2005). The CFTR associated protein CAP70 interacts with the apical Cl-/HCO₃- exchanger DRA in rabbit small intestinal mucosa. *Biochemistry* 44, 4477-4487.
- Ruppelt,A., Mosenden,R., Gronholm,M., Aandahl,E.M., Tobin,D., Carlson,C.R., Abrahamsen,H., Herberg,F.W., Carpen,O., and Tasken,K. (2007). Inhibition of T cell activation by cyclic adenosine 5'-monophosphate requires lipid raft targeting of protein kinase A type I by the A-kinase anchoring protein ezrin. *J. Immunol.* 179, 5159-5168.
- Salzer,U. and Prohaska,R. (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 97, 1141-1143.
- Sarbassov,D.D., Guertin,D.A., Ali,S.M., and Sabatini,D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sasaki,T., Kikuchi,A., Araki,S., Hata,Y., Isomura,M., Kuroda,S., and Takai,Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265, 2333-2337.
- Schaefer,L.H., Schuster,D., and Schaffer,J. (2004). Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach. *J. Microsc.* 216, 165-174.
- Schultheis,P.J., Clarke,L.L., Meneton,P., Miller,M.L., Soleimani,M., Gawenis,L.R., Riddle,T.M., Duffy,J.J., Doetschman,T., Wang,T., Giebisch,G., Aronson,P.S., Lorenz,J.N., and Shull,G.E. (1998). Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat. Genet.* 19, 282-285.

Schweinfest,C.W., Henderson,K.W., Suster,S., Kondoh,N., and Papas,T.S. (1993). Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 4166-4170.

Schweinfest,C.W., Spyropoulos,D.D., Henderson,K.W., Kim,J.H., Chapman,J.M., Barone,S., Worrell,R.T., Wang,Z., and Soleimani,M. (2006). *slc26a3* (*dra*)-deficient mice display chloride-losing diarrhea, enhanced colonic proliferation, and distinct up-regulation of ion transporters in the colon. *J. Biol. Chem.* 281, 37962-37971.

Scott,R.O., Thelin,W.R., and Milgram,S.L. (2002). A novel PDZ protein regulates the activity of guanylyl cyclase C, the heat-stable enterotoxin receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 22934-22941.

Seidler,U., Rottinghaus,I., Hillesheim,J., Chen,M., Riederer,B., Krabbenhoft,A., Engelhardt,R., Wiemann,M., Wang,Z., Barone,S., Manns,M.P., and Soleimani,M. (2008). Sodium and chloride absorptive defects in the small intestine in *Slc26a6* null mice. *Pflugers Arch.* 455, 757-766.

Seidler,U., Singh,A., Chen,M., Cinar,A., Bachmann,O., Zheng,W., Wang,J., Yeruva,S., and Riederer,B. (2009). Knockout mouse models for intestinal electrolyte transporters and regulatory PDZ adaptors: new insights into cystic fibrosis, secretory diarrhoea and fructose-induced hypertension. *Exp. Physiol* 94, 175-179.

Shepherd,P.R., Soos,M.A., and Siddle,K. (1995). Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase block exocytosis but not endocytosis of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 535-539.

Shogomori,H. and Brown,D.A. (2003). Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol. Chem.* 384, 1259-1263.

Silberg,D.G., Wang,W., Moseley,R.H., and Traber,P.G. (1995). The Down regulated in Adenoma (*dra*) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J. Biol. Chem.* 270, 11897-11902.

Silvis,M.R., Bertrand,C.A., Ameen,N., Golin-Bisello,F., Butterworth,M.B., Frizzell,R.A., and Bradbury,N.A. (2009). Rab11b regulates the apical recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in polarized intestinal epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 20, 2337-2350.

Simons,K. and Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

- Simons,K. and Toomre,D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Singer,S.J. and Nicolson,G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Singla,A., Dwivedi,A., Saksena,S., Gill,R.K., Alrefai,W.A., Ramaswamy,K., and Dudeja,P.K. (2010). Mechanisms of lysophosphatidic acid (LPA) mediated stimulation of intestinal apical Cl⁻/OH⁻ exchange. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 298, G182-G189.
- Soldati,T., Shapiro,A.D., Svejstrup,A.B., and Pfeffer,S.R. (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* 369, 76-78.
- Soleimani,M. (2006). Expression, regulation and the role of SLC26 Cl⁻. *Novartis. Found. Symp.* 273, 91-102.
- Sue,A.Q.A., Fialkow,L., Vlahos,C.J., Schelm,J.A., Grinstein,S., Butler,J., and Downey,G.P. (1997). Inhibition of neutrophil oxidative burst and granule secretion by wortmannin: potential role of MAP kinase and renaturable kinases. *J. Cell Physiol* 172, 94-108.
- Sun,F., Hug,M.J., Lewarchik,C.M., Yun,C.H., Bradbury,N.A., and Frizzell,R.A. (2000). E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J. Biol. Chem.* 275, 29539-29546.
- Swiatecka-Urban,A., Duhaime,M., Coutermarsh,B., Karlson,K.H., Collawn,J., Milewski,M., Cutting,G.R., Guggino,W.B., Langford,G., and Stanton,B.A. (2002). PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 277, 40099-40105.
- Takata,K., Tajika,Y., Matsuzaki,T., Aoki,T., Suzuki,T., Abduxukur,A., and Hagiwara,H. (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: water channel aquaporin-2 of kidney collecting duct cells. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 255-259.
- Theelin,W.R., Hodson,C.A., and Milgram,S.L. (2005). Beyond the brush border: NHERF4 blazes new NHERF turf. *J. Physiol* 567, 13-19.
- Touchot,N., Chardin,P., and Tavitian,A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 8210-8214.

- Trischler,M., Stoorvogel,W., and Ullrich,O. (1999). Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 24), 4773-4783.
- van de Graaf,S.F., Hoenderop,J.G., van der Kemp,A.W., Gisler,S.M., and Bindels,R.J. (2006). Interaction of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 with the intestine- and kidney-enriched PDZ protein NHERF4. *Pflugers Arch.* 452, 407-417.
- Verrey,F., Singer,D., Ramadan,T., Vuille-dit-Bille,R.N., Mariotta,L., and Camargo,S.M. (2009). Kidney amino acid transport. *Pflugers Arch.* 458, 53-60.
- Vlahos,C.J., Matter,W.F., Hui,K.Y., and Brown,R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241-5248.
- Wakabayashi,S., Shigekawa,M., and Pouyssegur,J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev.* 77, 51-74.
- Walker,N.M., Simpson,J.E., Yen,P.F., Gill,R.K., Rigsby,E.V., Brazill,J.M., Dudeja,P.K., Schweinfest,C.W., and Clarke,L.L. (2008). Down-regulated in adenoma Cl/HCO₃ exchanger couples with Na/H exchanger 3 for NaCl absorption in murine small intestine. *Gastroenterology* 135, 1645-1653.
- Wang,Z., Petrovic,S., Mann,E., and Soleimani,M. (2002). Identification of an apical Cl(-)/HCO₃(-) exchanger in the small intestine. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 282, G573-G579.
- Watanabe,C., Kato,Y., Sugiura,T., Kubo,Y., Wakayama,T., Iseki,S., and Tsuji,A. (2006). PDZ adaptor protein PDZK2 stimulates transport activity of organic cation/carnitine transporter OCTN2 by modulating cell surface expression. *Drug Metab Dispos.* 34, 1927-1934.
- Weinman,E.J., Biswas,R.S., Peng,G., Shen,L., Turner,C.L., E X, Steplock,D., Shenolikar,S., and Cunningham,R. (2007). Parathyroid hormone inhibits renal phosphate transport by phosphorylation of serine 77 of sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1. *J. Clin. Invest* 117, 3412-3420.
- Weinman,E.J., Steplock,D., Donowitz,M., and Shenolikar,S. (2000). NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry* 39, 6123-6129.

- Welker,P., Bohlick,A., Mutig,K., Salanova,M., Kahl,T., Schluter,H., Blottner,D., Ponce-Coria,J., Gamba,G., and Bachmann,S. (2008). Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 295, F789-F802.
- Wente,W., Stroh,T., Beaudet,A., Richter,D., and Kreienkamp,H.J. (2005). Interactions with PDZ domain proteins PIST/GOPC and PDZK1 regulate intracellular sorting of the somatostatin receptor subtype 5. *J. Biol. Chem.* 280, 32419-32425.
- Wheat,V.J., Shumaker,H., Burnham,C., Shull,G.E., Yankaskas,J.R., and Soleimani,M. (2000). CFTR induces the expression of DRA along with Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C62-C71.
- Wright,E.M. and Turk,E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447, 510-518.
- Wright,E.M., Turk,E., Hager,K., Lescale-Matys,L., Hirayama,B., Supplisson,S., and Loo,D.D. (1992). The Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *Acta Physiol Scand. Suppl* 607, 201-207.
- Wu,Y.W., Tan,K.T., Waldmann,H., Goody,R.S., and Alexandrov,K. (2007). Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 12294-12299.
- Xiong,Y., Antalfy,G., Enyedi,A., and Strehler,E.E. (2009). Apical localization of PMCA2w/b is lipid raft-dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 32-36.
- Yoo,B.K., He,P., Lee,S.J., and Yun,C.C. (2011). Lysophosphatidic acid 5 receptor induces activation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 via apical epidermal growth factor receptor in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol*.
- Yun,C.H., Oh,S., Zizak,M., Steplock,D., Tsao,S., Tse,C.M., Weinman,E.J., and Donowitz,M. (1997). cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3010-3015.
- Zachos,N.C., Hodson,C., Kovbasnjuk,O., Li,X., Thelin,W.R., Cha,B., Milgram,S., and Donowitz,M. (2008). Elevated intracellular calcium stimulates NHE3 activity by an IKEPP (NHERF4) dependent mechanism. *Cell Physiol Biochem.* 22, 693-704.

Zhang,G.H., Zhu,J.X., Xue,H., Fan,J., Chen,X., Tsang,L.L., Chung,Y.W., Xing,Y., and Chan,H.C. (2007). Dopamine stimulates Cl(-) absorption coupled with HCO(3)(-) secretion in rat late distal colon. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 188-195.

8 ANHANG

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Überblick über die Mitglieder der NHERF-Familie.....	7
Abbildung 1.2: Partielle Raft-Lokalisation von NHE3 und DRA.....	14
Abbildung 1.3: Recycling-Wege	16
Abbildung 2.1: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab5a	26
Abbildung 2.2: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab7a	27
Abbildung 2.3: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11a	27
Abbildung 2.4: pcDNA3.1/Puromycin/mCherry-HA-Rab11aS25N	28
Abbildung 2.5: Gewinnung eines mit Endosomen angereicherten Ausgangsmaterials und Immunisolierung von Rab5a-, Rab7a- und Rab11a-haltigen Vesikeln	39
Abbildung 3.1: Reduktion der DRA-Aktivität durch Störung der Raft-Integrität in HEK- Zellen	49
Abbildung 3.2: Reduktion der DRA-Aktivität durch Störung der Raft-Integrität in Caco- 2/BBE-Zellen	51
Abbildung 3.3: Verminderung der Oberflächenexpression von DRA nach Störung der Raft- Integrität in HEK-Zellen.....	53
Abbildung 3.4: Reduktion der DRA-Aktivität durch Inhibition der PI3-Kinase in HEK-Zellen	55
Abbildung 3.5: Inhibition der PI3-Kinase; keine Phosphorylierung von Akt	56
Abbildung 3.6: Reduktion der Oberflächenexpression von DRA nach Inhibition der PI3- Kinase in HEK-Zellen.....	57

Abbildung 3.7: Nicht additive Reduktion der DRA-Aktivität durch gleichzeitige Inhibition der PI3-Kinase und Störung der Raft-Integrität in HEK-Zellen	59
Abbildung 3.8: Eine Inhibition der PI3-Kinase hat keinen Einfluss auf die Raft-Assoziation von DRA in HEK-Zellen	61
Abbildung 3.9: Keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Akt durch Störung der Raft-Integrität in HEK-Zellen	62
Abbildung 3.10: Expression von EGFP-DRA und EGFP-DRA-ETKFminus an der Plasmamembran in HEK-Zellen.....	64
Abbildung 3.11: Das PDZ-Interaktionsmotiv beeinflusst die Degradation von DRA in HEK-Zellen	65
Abbildung 3.12: Expression von mCherry-HA-Rab5a, -7a und -11a in HEK/EGFP-DRA- und HEK/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen	68
Abbildung 3.13 A: Anreicherung von EGFP-DRA, EGFP-DRA-ETKFminus sowie exogen und endogen exprimiertem Rab5a in der Interphase zwischen 20% und 35% Sucrose	71
Abbildung 3.14: Immunisolierung von frühen, späten und recycling Endosomen in HEK-Zellen	76
Abbildung 3.15: Kontrollexperiment zur Immunisolierung in HEK-Zellen	77
Abbildung 3.16: Co-Lokalisation von DRA mit Rab5a, Rab7a und Rab11a	80
Abbildung 3.17: Expression von mCherry-HA-Rab11a und mCherry-HA-Rab11aS25N nach transienter Transfektion in HEK/EGFP-DRA-Zellen	81
Abbildung 3.18: Einfluss der GTPase Rab11a auf die DRA-Aktivität in HEK-Zellen	82
Abbildung 3.19: Einfluss der GTPase Rab11a auf die Oberflächenexpression von DRA in HEK-Zellen	83
Abbildung 4.1: Modell exozytotischer Trafficking-Pfade von DRA	90
Abbildung 4.2: Modell der endosomalen Lokalisation von DRA.....	93

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Bakterienstämme.....	21
Tabelle 2.2:	Pipettieransatz für die Ligation.....	25
Tabelle 2.3:	Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei 1,5 mm Geldicke.....	42
Tabelle 2.4:	Primärantikörper – für die Immundetektion und Immunisolation.....	44
Tabelle 2.5:	Sekundärantikörper – für die Immundetektion	45

8.3 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ²⁺	Calciumchlorid
Caco-2/BBE	human colon adenocarcinoma cell line
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cdc2	cyclin-dependent-kinase 2
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGKII	cGMP abhängige Proteinkinase II
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHX	Cycloheximid
Cl ⁻	Chlorid
CLD	chlorid losing diarrhea
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CURL	compartment for the uncoupling of receptor and ligand
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIDS	4,4'-Diisothiozynostilben-2',2'-Disulfonsäure
DIG	detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dox	Doxycyclin
DRA	down-regulated in adenoma
DRM	detergent resistant membrane
DTT	Dithiothreitol
E3KARP	NHE3 kinase A regulatorisches Protein
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EEA1	early endosome antigen 1
EGF	epidermal growth factor

ENaC	epithelialer Natrium-Kanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin / Radixin / Moesin
ETKF	Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin
FCS	fetal bovine serum
g	Gramm
GAP	GTPase-activating Protein
GCC	Guanylylcyclase
GDF	GDI displacement factor
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Nukleotid Exchange Faktor
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GRK6A	G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinase A6
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Hydroxid-Ion
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat; Bicarbonat
HEK	Human embryonic kidney
IKEPP	kidney enriched PDZ protein
K ⁺	Kalium
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPA	Lysophosphatidylsäure
M	Molar
MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
MgCl ²⁺	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MVB	Multivesicular bodies
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ - Austauscher
NHERF	NHE regulierender Faktor (EBP50)
Npt2a	Natrium/Phosphat-Cotransporter
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PAT1	putative anion transporter 1
PBS	phosphate buffered saline
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PDZ	Adapterprotein, <u>P</u> SD 95, <u>D</u> LG, <u>Z</u> O-1
PDZK1	PDZ domain protein kidney 1
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PiP(5)K α	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase
Pis	Phosphoinositide
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP1	Phosphatase 1
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(3)P	Phosphoinositol-3-Phosphat
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphoinositol-3,4-Diphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat
PTH	Parathormon

Rab	<u>ras</u> -like in rat <u>brain</u>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNX27	sorting nexin 27
STAT	single transducer and activator of transcription
TBST	tris buffered saline containing Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N,N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TNE	Tris/NaCl/EDTA
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

8.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Stuttgart, den 29. November 2011

Simone Lissner

8.5 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve und Herrn PD. Dr. Hans-Georg Lamprecht für die Vergabe des interessanten Themas, ihrer Diskussionsbereitschaft und ihren Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Lilia Nold, Dr. Chih-Jen Hsieh, Melanie Ziegler und Sabine Neukamm für ihre kontinuierliche Unterstützung im Labor, für Vorschläge und Hilfestellungen bei Fragen und Problemen.

Danke sagen möchte ich den Kolleginnen und Kollegen aus den Laboren des Bettenbaus West für die gute Zusammenarbeit und für ihre Hilfsbereitschaft.

Für das Korrekturlesen meiner Dissertation danke ich Martin Schumacher und Dr. Brigitte Sessler.

Meinem Freund Michael Schumacher, meiner Mutter Marianne Lissner, meinem Vater Karl-Wilhelm Lissner und meinem Bruder Oliver Lissner danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

8.6 Lebenslauf

SIMONE LISSNER

Geboren am 15. Mai 1981 in Tübingen

SCHULAUSBILDUNG

- | | |
|-------------------|---|
| 09/1988 – 02/1998 | Freie Waldorfschule Tübingen |
| 02/1998 – 08/1999 | Albert-Schweitzer-Realschule Tübingen |
| 09/1999 – 07/2002 | Mathilde-Weber-Schule Tübingen
Berufliches Gymnasium – ernährungswissenschaftliche Richtung;
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Note 1,2) |

STUDIUM

- | | |
|-------------------|---|
| 10/2002 – 04/2008 | Studium der Ernährungswissenschaft an der Universität
Hohenheim; Schwerpunkte: Spezielle Biochemie & Klinische
Ernährung |
| 02/2005 | Diplomvorprüfung (Note 1,1) |
| 07/2007 – 04/2008 | Diplomarbeit
„Assoziation des intestinalen Anionenaustauschers DRA (down-
regulated in adenoma) mit Lipid Rafts“ (Note 1,0) |
| 04/2008 | Erlangen des akademischen Grades Diplom-
Ernährungswissenschaftlerin (Note 1,0) |

PROMOTION

- | | |
|-------------------|---|
| 08/2008 – 12/2011 | Promotion (Dr. rer. nat.) am Institut für Biologische Chemie und
Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, Prof. Dr. Lutz
Graeve

in Kooperation mit der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I, PD. Dr. Hans-Georg Lamprecht
„Intrazelluläres Trafficking des intestinalen Anionenaustauschers
DRA (down-regulated in adenoma; SLC26A3)“ |
|-------------------|---|

8.7 Publikationen

PUBLIKATIONEN

Lamprecht G, Hsieh CJ, **Lissner S**, Nold L, Heil A, Gaco V, Schäfer J, Turner JR, Gregor M. (2009). Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium. *J Biol Chem.* 284(29): 19744-53.

Lissner S, Nold L, Hsieh CJ, Turner JR, Gregor M, Graeve L, Lamprecht G. (2010). Activity and PI3-kinase dependent trafficking of the intestinal anion exchanger downregulated in adenoma depend on its PDZ interaction and on lipid rafts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299(4): G907-20.

Lissner S, Nold L, Hsieh CJ, Turner JR, Gregor M, Graeve L, Lamprecht G. (2011). Activity and surface expression of the intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA). *Z Gastroenterol.* 49: S22-S24.

Lissner S, Hsieh CJ, Nold L, Graeve L, Lamprecht G. (2011). The endocytic recycling of the intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma is regulated by PDZ interaction and Rab11a. *Manuskript zur Veröffentlichung fertiggestellt.*

VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN

- | | |
|---------|--|
| 10/2008 | 63. JAHRESTAGUNG DER DGVS (BERLIN)

Posterpräsentation und Vortrag: „Der intestinale Anionenaustauscher DRA und die mit ihm assoziierten PDZ-Adapterproteine PDZK1, IKEPP und E3KARP sind partiell in Lipid Rafts lokalisiert und interagieren dort miteinander“ |
| 11/2008 | TRANSPORTER TAGE (GÖTTINGEN)

Vortrag: „The intestinal anion exchanger DRA is partially localized within lipid rafts“ |
| 05/2009 | DIGESTIVE DISEASE WEEK (CHICAGO, USA)

Posterpräsentation: „The intestinal anion exchanger DRA (downregulated in adenoma) is partially localised within lipid rafts“ |

- 09/2009 64. JAHRESTAGUNG DER DGVS (HAMBURG)
Vortrag: „ Bedeutung von Lipid Rafts für die Funktion des intestinalen Anionen-austauschers DRA“
- 10/2009 TRANSPORTER TAGE (GÖTTINGEN)
Vortrag: „Lipid rafts affect the function of the intestinal anion exchanger DRA“
- 05/2010 DIGESTIVE DESEASE WEEK (NEW ORLEANS, USA)
Vortrag: „Activity of the intestinal anion exchanger DRA (SLC26A3) depends on its lipid raft association and requires the interaction with PDZ adaptor proteins“
- 07/2010 MUCOSAFUNKTION-MEETING (LICH)
Vortrag: „Bedeutung der Lipid Raft Assoziation des intestinalen Anionen Austauschers DRA für dessen Transport Aktivität und PI3-Kinase abhängigen Trafficking“
- 05/2011 BAD HERRENALBER TRANSPORTER-TAGE (BAD HERRENALB)
Posterpräsentation: „Immunisolation Rab-haltiger-Vesikel zur Aufklärung PDZ abhängiger Recycling-Wege“
- 09/2011 66. JAHRESTAGUNG DER DGVS (LEIPZIG)
Posterpräsentation und Vortrag: „Aufklärung des Recyclingweges des intestinalen Anionenaustauschers DRA (down-regulated in adenoma, SLC26A3) mittels Immunisolation Rab-haltiger Vesikel“