

**Identifizierung und Charakterisierung von
Interaktionspartnern des Na⁺/Phosphat Kotransporters
Typ II**

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie
der Universität Dortmund**

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von Dipl.-Chem. Leif Dehmelt

aus Köln

Dortmund, im April 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1997 bis April 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von PD Dr. Andreas Werner in der Abteilung Epithelphysiologie von Herrn Prof. Dr. Rolf K. H. Kinne durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. A. Werner
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser

Tag der Einreichung: 18. April 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 2000

1	EINLEITUNG	9
1.1	Physiologie der Säugetiere	9
1.2	Funktion des Na ⁺ /Phosphat-Kotransportsystems NaPi-II	10
1.3	Struktur von NaPi-IIa	13
1.4	PDZ-Transporter Interaktionen	14
2	MATERIALIEN	16
2.1	Chemikalien	16
2.1.1	Enzyme	16
2.1.2	Antikörper	16
2.1.3	Oligonukleotide	17
2.1.4	Plasmide	17
2.1.5	Puffer, Lösungen und Medien	18
2.2	Zellsysteme	19
2.2.1	Bakterienstämme	19
2.2.2	Hefestämme	19
2.2.3	Säugerzellen	20
2.3	Instrumentation	20
3	METHODEN	21
3.1	Molekularbiologische Techniken	21
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	21
3.1.2	Klonierungstechniken	21
3.1.3	Polymerase Kettenreaktion	22
3.1.4	Amplifikation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	22
3.1.5	Einführung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (Step-up PCR)	23
3.1.6	Sequenzierung	23
3.1.7	Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)	23
3.1.8	Sequenzanalysen	24

3.2	Immunologische Techniken	24
3.2.1	Herstellung des Antikörpers (Biotrend, Köln)	24
3.2.2	Western-Blot	25
3.2.3	Immunhistochemie an OK-Zellen	25
3.2.4	Immunhistochemie an Gewebeschnitten	25
3.3	Two-Hybrid Screen	26
3.3.1	Transformation des Reporterstamms L40	26
3.3.2	Transformation der Two-Hybrid Bibliothek	27
3.4	Library Screening	27
3.5	5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	28
3.5.1	Homopolymeres Tailing	28
3.5.2	SMART-Variante (Switch Mechanism at the 5' end of RNA Templates)	28
3.6	Bestimmung der Gewebeverteilung	29
3.6.1	PCR mit einem MTC cDNA-Panel	29
3.6.2	Northern Blot Analyse	29
3.7	Expressionssystem <i>Escherichia coli</i>	30
3.7.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Affinitätschromatographie	30
3.7.2	Blot-Overlay	30
3.8	Expressionssystem Opossum Kidney-Zellen (OK-Zellen)	31
3.8.1	Zellaufzucht und Zellkultur	31
3.8.2	Membranpräparation	31
3.8.3	Transfektion	32
3.9	Membranpräparationen aus tierischem Gewebe	32
3.9.1	Präparation von Bürstensaumvesikeln aus der Mäuseniere	32
3.9.2	Präparation von Plasmamembranen aus der Rattenniere	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Two-Hybrid Screen	34
4.1.1	Konstruktion der Ködervektoren pCMLexA und pCZFLexA	35
4.1.2	Bestimmung der Selbstaktivierung des Reportergens	36
4.1.3	Screening der Bibliothek und Bestimmung der Spezifität von interagierenden Klonen	37

4.2	<i>In vitro</i> Interaktion von NaPi-IIa[C-Term] mit C160-[PDZ]	39
4.2.1	Expression und Aufreinigung von GST-NaPi-IIa-[C-Term] und MBP-C160-[PDZ]	40
4.2.2	Konstruktion der Expressionsvektoren pCMGEX und p160MBP	40
4.2.3	Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine	41
4.2.4	Blot Overlay	42
4.3	Klonierung der vollständigen C160 cDNA	43
4.3.1	PCR-Screening der cDNA Bibliothek	45
4.3.2	5'-RACE durch homopolymeres Tailing	45
4.3.3	SMART 5'-RACE	47
4.3.4	Konstruktion der kompletten C160 cDNA	48
4.3.5	Sequenzanalysen von C160	49
4.4	Gewebeverteilung von C160	50
4.4.1	Multiple Tissue cDNA-Panel (MTC-Panel)	50
4.4.2	Northern-Blot	51
4.5	Heterologe Expression in Opossum Kidney-Zellen	52
4.5.1	Nachweis eines homologen Transkripts	53
4.5.2	Nachweis eines homologen Proteins	56
4.6	Lokalisierung von C160 in der Mäuseniere	61
4.6.1	Western-Blot	62
4.6.2	Immunhistochemie	62
4.7	Ergänzende immunhistochemische Untersuchungen zu C160	64
4.8	Lokalisierung von Shank2 in der Mäuseniere	67
4.8.1	Western-Blot	67
4.8.2	Immunhistochemie	68
4.9	Lokalisierung von Shank2 in der Rattenniere	69
4.9.1	Western-Blot Analysen	70
4.9.2	Immunhistochemie an Rattenschnitten	70
5	DISKUSSION	73
5.1	Shank2	75

5.2	Shank3b/C160	76
5.3	Shank1	77
5.4	Bewertung der Informationen zur Proteinfamilie Shank	78
5.5	Die luminale Sortierung von Shank	78
5.6	Die Bedeutung von Shank für die Sortierung und Regulation von NaPi-IIa	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	ANHANG	82
7.1	Konstruktion von Plasmiden	82
7.1.1	pCMLexA und pCZFLEXA	82
7.1.2	pCMGEX	82
7.1.3	p160MBP	83
7.2	Sequenzierung von C160/Shank3b	83
7.3	Verwendete Oligonukleotide	83
7.3.1	Standardprimer	83
7.3.2	Klonierung von pCMLexA, pZFLexA, pCMGEX und p160MBP	84
7.3.3	Gewebeverteilung und Screening der Bibliothek	84
7.3.4	5'-RACE	84
7.3.5	Konstruktion von pC160	85
7.3.6	Degenerierte Suchprimer	85
7.3.7	Sequenzierung von pC160 und pC160-3'	85
7.4	Sequenzen	86
7.4.1	Sequenz von Shank3b/C160 der Maus	86
7.4.2	Vorgeschlagene Sequenz für Shank3b/C160 aus dem Menschen	90
7.4.3	Sequenz von NG22H	95
8	LITERATUR	96

Abkürzungsverzeichnis

AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
ATZ	3-Aminotriazol
BBM	Bürstensaummembrane
BCIP	5-Bromo-1-Chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	Cystische-Fibrose-Transmembranregulator
Cy2	Indodicarbocyanin Farbstoff 2
Cy3	Indodicarbocyanin Farbstoff 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
dNTP	Deoxynukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBP-50	Ezrin bindendes Protein 50
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G3PDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaPi-IIa	Na ⁺ /Phosphat Kotransporter Typ IIa
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
NHE3	Natrium/Protonen Austauscher Typ 3
NHE-RF	Natrium/Protonen Austauscher regulierender Faktor
OK-Zellen	Beutelrattennieren Zellen (<i>Opossum Kidney-Zellen</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
MBP	Maltose bindendes Protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion

P _i	Phosphat
PTH	Parathyroidhormon
PDZ-Domäne	Domäne benannt nach den Proteinen PSD-95, Dlg und ZO-1
RACE	schnelle Amplifizierung von cDNA Enden
RPGR	Retinitis Pigmentosa G-Protein Regulator
RT-PCR	Polymerase Kettenreaktion mit reverser Transkription
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SH3-Domäne	src homologe Domäne 3
SSTR2	Somatostatinrezeptor Typ2
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
t-RNA	transfer Ribonukleinsäure
UTP	Uridin-5'-Triphosphat

1 Einleitung

Anorganisches Phosphat (P_i) ist ein grundlegender Baustein aller Lebewesen. In einem DNA-Strang werden die einzelnen Nukleotide durch Phosphatgruppen verbunden. In ATP dient es der Umwandlung von Energie. Im Zusammenhang mit G-Proteinen wird es in GTP/GDP zur Festlegung des Aktivierungszustands und hiermit zur Speicherung von Information verwendet. In höheren Lebewesen, insbesondere in Wirbeltieren, spielt biomineralisiertes Phosphat in den Knochen oder Zähnen eine besondere Rolle. Obwohl die Zellen des Körpers einen hohen Bedarf an Phosphat haben, darf die Konzentration dieses Ions im Blut nicht zu hoch ansteigen. Wenn das Produkt der Konzentrationen von Ca^{2+} und Phosphat das Löslichkeitsprodukt von $Ca_3(PO_4)_2$ übersteigt, fällt dieses im Körper aus. Um dies zu vermeiden, wird die Aufnahme und Ausscheidung von Phosphat im Körper reguliert. Phosphat wird durch den Darm vom Körper aufgenommen, in den Knochen gespeichert und über die Nieren ausgeschieden. Die Ausscheidung von Phosphat ist in der Niere sehr detailliert untersucht worden.

1.1 Physiologie der Säugetierniere

Die Nieren sind für die Regulation wichtiger Körperfunktionen essentiell. Durch ihre Funktion wird der Wasser- und Elektrolythaushalt wie auch der Blutdruck reguliert. Außerdem dient die Niere zur Reinigung des Bluts von Abfall- und Giftstoffen. In Abb. 1 ist der Aufbau der funktionellen Einheit der Niere, das Nephron schematisch dargestellt.

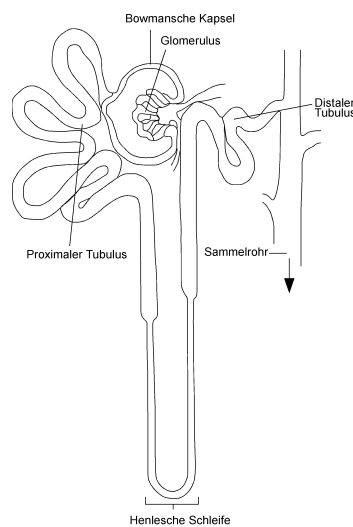


Abb. 1: Aufbau eines Nephrons

In den Nierenkörperchen (Glomeruli) werden kleine Moleküle (< 10 kD) aus dem Blut filtriert. Aus dem Filtrat (Primärharn) werden im tubulären System zahlreiche Nährstoffe und Ionen sowie Wasser resorbiert. Hierbei spielen membranständige Na^+ -Kotransportsysteme eine zentrale Rolle. Die intrazelluläre Na^+ -Konzentration wird durch die Na^+/K^+ -ATPase unter Aufwendung von Energie gegenüber der extrazellulären Konzentration verringert. Durch den Transport von K^+ in die entgegengesetzte Richtung wird das elektrische Potential der Zelle zum Teil ausgeglichen. Der gebildete Na^+ -Konzentrationsgradient kann von der Zelle verwendet werden, um den Einstrom von Substanzen, wie beispielsweise Glucose, Aminosäuren, Chlorid, Sulfat oder Phosphat, mit dem Na^+ -Einstrom zu koppeln. Im proximalen Tubulus wird der Hauptteil der filtrierten Substanzen zurückgewonnen. In der Henleschen Schleife werden hauptsächlich Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium und Wasser resorbiert. Im distalen Tubulus und im Sammelrohr findet die feine regulatorische Abstimmung des Harns statt, welcher von hier in den Harnleiter übergeht.

1.2 Funktion des Na^+ /Phosphat-Kotransportsystems NaPi-II

Auf molekularer Ebene wurden mehrere membranständige Na^+ /Phosphat-Kotransportsysteme in Wirbeltieren charakterisiert (siehe Tab. 1). Der Proteinfamilie NaPi-II wird hierbei eine Schlüsselrolle in der Regulation des Phosphathaushalts zugeschrieben. Es sind zwei verschiedene Untergruppen bekannt, NaPi-IIa und NaPi-IIb, welche sich in der Proteinsequenz und der Lokalisation im Körper unterscheiden.

Die renale Isoform NaPi-IIa wird hauptsächlich in Zellen des proximalen Tubulus exprimiert. Hier erfolgt der Hauptteil der Rückresorption des filtrierten Phosphats (60-70% des filtrierten Phosphats) (Strickler 1964). Die meisten Untersuchungen wurden an der Isoform aus der Ratte durchgeführt. NaPi-IIa wurde jedoch auch aus OK-Zellen (Opossum-Kidney Zellen), Kaninchen, der Maus, dem Schaf und dem Menschen isoliert. Das Protein wird durch einen Sortiermechanismus zur luminalen Bürstensaummembran geleitet. Wie in Abb. 2 gezeigt, führt diese Lokalisation zur Akkumulation von Phosphat in der Zelle. Durch bisher unidentifizierte Leitfähigkeiten in der basolateralen Membran wird das Phosphat von hier in das Blut transportiert. Der Einstrom von Phosphat ist mit dem Einstrom von Natrium gekoppelt. Durch das hohe Na^+ -Konzentrationsgefälle zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum ist dieser Prozeß stark begünstigt. Die Kopplung der Ströme erlaubt die Akkumulation von Phosphat gegen einen Konzentrationsgradienten.

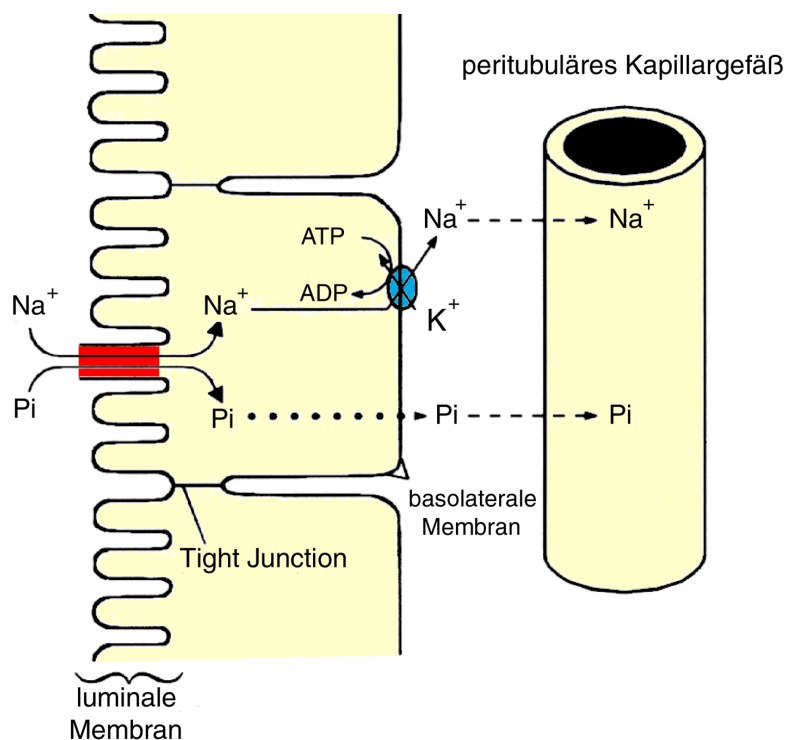


Abb. 2: Phosphattransport in proximalen Tubuluszellen. Durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase (blau) wird ein Na^+ -Konzentrationsgradient aufrecht erhalten. Der begünstigte Na^+ -Einstrom wird durch den Na^+ /Phosphat Kotransporter NaPi-IIa (rot) mit dem luminalen Einstrom von Phosphat (Pi) gekoppelt, um eine Akkumulation und einen gerichteten Transport von Phosphat gegen einen Konzentrationsgradienten zu erreichen.

Die Aktivität von NaPi-IIa kann sehr schnell variiert werden. Eine akute Erhöhung der zugeführten Phosphatmenge in der Nahrung eines auf eine niedrige Phosphatdiät adaptierten Tieres führt zur Deaktivierung des Phosphattransports. Umgekehrt führt eine akute Erniedrigung der zugeführten Phosphatmenge eines auf hohe Phosphatdiät adaptierten Tieres zur Aktivierung. Falls die Konzentration von Ca^{2+} im Blut abfällt, wird das Parathyroidhormon (PTH) sezerniert, welches die Rückresorption von Phosphat ebenfalls hemmt. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden in früheren Arbeiten durch Transportstudien an isolierten Bürstensaumvesikeln (Evers 1978, Stoll 1979) untersucht. In diesen Studien konnte eine Abnahme von V_{max} beobachtet werden, was auf eine veränderte Zahl aktiver Transporter in der Plasmamembran hinweist. Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen an Rattennierenschnitten und OK-Zellen konnte dies bestätigt werden (Pfister 1997, Pfister 1998). Hiernach wird der Transporter nach der Bildung in subapikalen Vesikeln gespeichert. Durch Exocytose dieser Speichervesikeln wird die Zahl aktiver Transporter in der Plasmamembran erhöht. Durch Endocytose wird die Zahl der aktiven Transporter vermindert. Die endocytierten Transporter werden in einem subapikalen Kompartiment akkumuliert. Von hier werden sie in die Lysosomen geleitet, in denen sie degradiert werden (Pfister 1998). Andere Transporter wie Glut4 (Pessin 1999 review) oder Aquaporin-2

(Deen 1999 review) können im Gegensatz hierzu nach der Endocytose erneut in die Membran eingebaut werden. Die Mikrotubuli spielen in diesen Sortierungsmechanismen eine wichtige Rolle. Colchizin und Nocodazole, welche das Mikrotubuliskelett zerstören, können die Aktivierung gespeicherter NaPi-IIa Transporter inhibieren. Außerdem wird der Weg zwischen dem subapikalen Kompartiment und den Lysosomen blockiert. Der erste Schritt der Inhibition wird jedoch durch diese Substanzen nicht blockiert (Hansch 1993, Loetscher 1999). Möglicherweise spielt in diesem Fall das Aktincytoskelett eine wichtige Rolle.

Die Isoform NaPi-IIb zeigt ein breiteres Expressionsmuster. Das Protein wird hauptsächlich im Darm, jedoch je nach Spezies auch in Niere, Leber, Gonaden und Lunge bzw. Kiemen exprimiert. Die ersten Untersuchungen zu dieser Isoform wurden in Fischsystemen durchgeführt. In der Flunder wird der Transporter sowohl im Darm als auch in der Niere exprimiert (Kohl 1996). Interessanterweise wird das Protein in diesem Organismus je nach Zelltyp in unterschiedliche Seiten der polarisierten Zelle sortiert. Im Darm ist das Protein luminal lokalisiert, in der Niere je nach Tubulusabschnitt luminal oder basolateral. Im Zebrafisch sind zwei unterschiedliche Typ IIb Transporter auf mRNA-Ebene identifiziert worden (Nalbant 1999). Eine dieser Isoformen ist wie in der Flunder sowohl in der Niere als auch im Darm lokalisiert. Die funktionelle Bedeutung der zweiten Isoform ist jedoch noch unklar.

Aus der Maus ist ebenfalls eine NaPi-IIb-Form isoliert worden (Hilfiker 1998). Diese Isoform wird ebenfalls in Darm und Niere exprimiert und durch das Phosphatangebot reguliert (Hattenhauer 1999, Traebert, 1999). Bisher konnte aber noch keine NaPi-IIa Isoform in den Fischsystemen isoliert werden. Es ist möglich, daß NaPi-IIb in dieser Stufe der Evolution die Funktion von NaPi-IIa übernimmt.

1.3 Struktur von NaPi-IIa

Es wurde experimentell gezeigt, daß NaPi-IIb der Flunder und NaPi-IIa der Ratte einen intrazellulären N-Terminus, eine große extrazelluläre, glycosylierte Schleife und einen intrazellulären C-Terminus besitzen (Kohl 1998, Lambert 1999). Die Zahl der Transmembrandomänen ist noch unklar. Aufgrund von Berechnungen, welche auf der Hydrophobizität von Segmenten der Peptidkette beruhen, werden acht Transmembrandomänen vorhergesagt (Abb. 3).

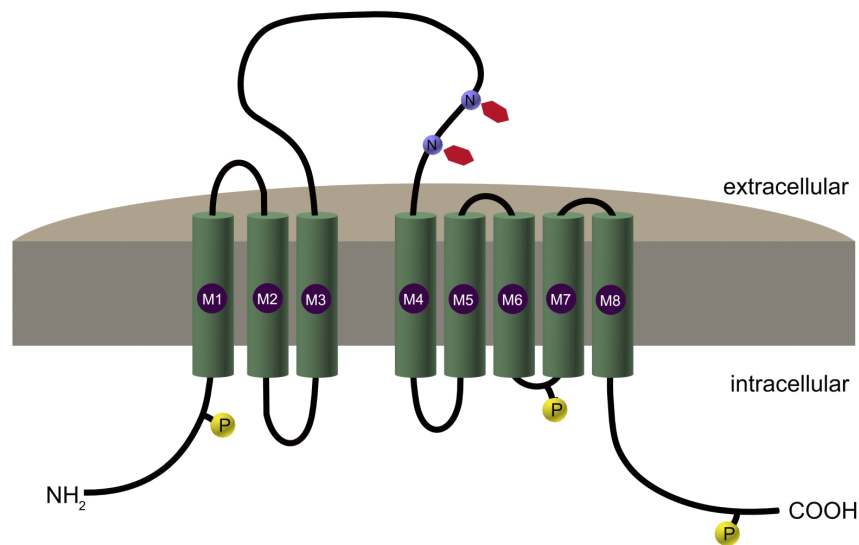


Abb. 3: Strukturmodell von NaPi-IIa der Ratte, blau: extrazelluläre N-Glycosylierungsmotive, gelb: intrazelluläre Motive für Protein Kinase C

Im Bereich der extrazellulären Schleife wird das Protein partiell durch einen noch unbekanntem Mechanismus geschnitten. Die einzelnen Teile des Transporters werden hiernach über eine Disulfidbrücke zusammengefügt (Kohl 1998, Paquin 1999). Möglicherweise hat diese posttranslationale Modifikation einen Einfluß auf die Transportrate des Proteins. Der N-Terminus und die extrazelluläre Schleife des Moleküls unterscheiden sich in den verschiedenen Isoformen erheblich. Der C-Terminus, insbesondere die letzten Aminosäuren, sind hingegen bei allen isolierten Isoformen sehr ähnlich (Tab. 1).

NaPi Typ IIa		
Maus	ALPAH HN ATRL	(Hartmann 1995)
Opossum	GVLSQ HN ATRL	(Sorribas 1994)
Ratte	ALPAH HN ATRL	(Magagnin 1993)
Kaninchen	ALPAH HN ATRL	(Verri 1995)
NaPi Typ IIb		
Zebrafisch	DSCEIL KAT SL	(Nalbant 1999)
Flunder	DTKEASK A THL	(Werner 1994)
Maus	SMKALSNT T TVF	(Hilfiker 1998)

Tab. 1 Vergleich der C-Termini verschiedener NaPi Typ IIa und IIb Transporter

Hier fällt besonders ein Strukturmotiv (**A-T-R-L-COOH**) auf, welches mit einer sogenannten PDZ-Domäne (benannt nach den Proteinen PSD-95, disks-large und ZO-1) von Proteinen interagieren kann (Songyang 1997).

1.4 PDZ-Transporter Interaktionen

PDZ-Domänen sind in zahlreichen Adapterproteinen vorhanden, die für die Regulation, Sortierung und Organisation von Transportern und Rezeptoren wichtig sind. Eines dieser Proteine, NHE-RF (auch EBP-50 genannt) interagiert über ein internes PDZ-bindendes Motiv mit dem Na⁺/H⁺-Austauscher NHE3 und ist in vielen regulatorischen Prozessen an der Plasmamembran beteiligt (Minkoff 1999 review). Außerdem interagiert dieses Adapterprotein mit dem C-Terminus von CFTR (**D-T-R-L-COOH**) und/oder dem β -adrenergen Rezeptor (**E-T-R-L-COOH**). Nach Deletion der letzten drei Aminosäuren von CFTR, wird dieses Protein nicht mehr zur luminalen Membran sortiert (Moyer 1999). Die Autoren schließen hieraus, daß die Bindung an NHE-RF für die luminal Sortierung von CFTR benötigt wird. NHE-RF erkennt eine Sequenz, welche dem C-Terminus von NaPi-IIa sehr ähnlich ist (**A-T-R-L-COOH**). Daraus ergab sich die Hypothese, daß ein ähnliches Protein an der luminalen Sortierung oder Regulation des Na⁺/Phosphat-Kotransportsystems NaPi-IIa beteiligt ist.

Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, mögliche Interaktionspartner für das Na⁺/Phosphat Kotransportsystem NaPi-IIa der Maus, durch einen Two-Hybrid Screen in Hefe zu identifizieren. Durch diese Methode können Proteine erkannt werden, welche in einem artifiziellen *in vivo* System miteinander interagieren. Die Interaktion eines aussichtsreichen Kandidaten soll mit einer unabhängigen Methode *in vitro* bestätigt werden. Anschließend soll die vollständige cDNA, welche

für das Protein kodiert, kloniert werden. Immunhistochemische Methoden sollen zur Lokalisation des Proteins im Gewebe verwendet werden. Zusammen mit den Informationen aus der Sequenz kann hierdurch die physiologische Bedeutung des Interaktionspartners beurteilt werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Es wurden ausschließlich Chemikalien von p. A. Qualität der Firmen Sigma (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) verwendet. Kits für die Präparation von Plasmid-DNA, totaler RNA, eukaryontischen Transfektion von DNA sowie für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden von Qiagen (Hilden) bezogen. Kulturmedien und Molekulargewichtstandards wurden von Gibco BRL (Karlsruhe) und NEB (Schwalbach) bezogen. Als DNA-Standard wurde die 1 kb DNA-Leiter von Gibco BRL und die 100bp und 1kb Leiter von NEB verwendet. Als RNA-Standard wurde die 0.24-9.5kb RNA-Leiter von NEB eingesetzt. Als Molekulargewichtstandard für SDS-Polyacrylamidgele wurde die 10 kD Leiter als auch der vorgefärbte Marker für niedriges Molekulargewicht von NEB verwandt. Radioaktives ^{32}P -Orthophosphat wurde von der Firma Amersham (Braunschweig) erhalten und ^{32}P - α UTP wurde von NEN bezogen. Die Mäusenieren cDNA-Bibliothek wurde von Gibco BRL erhalten. Der MTC cDNA-Panel wurde von Clontech (Heidelberg) bezogen. Zur Detektion von enzymgekoppelten sekundären Antikörpern wurde das ECL Kit von Amersham (Freiburg) oder das BCIP/NBT System von Promega (Mannheim) verwendet.

2.1.1 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen NEB (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg) und MBI Fermentas (St. Leon) bezogen. Die T4 DNA-Ligase stammte von Gibco BRL (Karlsruhe). Die *in vitro* Transkription wurde mit T7, T3 und SP6 RNA-Polymerase von Promega (Mannheim) durchgeführt. PCR Reaktionen wurden mit *Taq* DNA-Polymerase von Sigma (Steinheim), *rTth* Polymerase XL von Perkin-Elmer (Weiterstadt) und *Pfx* Polymerase von Gibco BRL durchgeführt. Für die reverse Transkription wurde Superscript RT von Gibco BRL oder AMV RT von Promega verwendet.

2.1.2 Antikörper

Der monoklonale Antikörper gegen Maltose bindendes Protein wurde im hauseigenen Labor hergestellt und der Antikörper gegen Glutathion-S-Transferase wurde von Sigma (Steinheim) bezogen. Der polyklonale Peptidantikörper gegen C160/SHANK3b wurde von der Firma Biotrend

(Köln) produziert und aufgereinigt. Der polyklonale Antikörper gegen Shank2 (3858) wurde von Prof. E. Kim (Pusan National University, Korea) zur Verfügung gestellt. Antikörper gegen MHCII der Ratte (Ox-6) und CD83 des Menschen wurden von DAKO (Glostrup, Dänemark) bzw. Pharmingen (San Diego, USA) bezogen. Mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper wurden von Promega (Mannheim) erhalten. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (gekoppelt mit Cy3, Cy2 oder FITC) der Firma Dianova (Hamburg) durchgeführt.

2.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden auf einem Beckman Oligo 1000 im 0.03 µmol-Maßstab synthetisiert und nach NAP-10 Gelfiltration (Pharmacia, Freiburg) zur Sequenzierung oder PCR-Amplifizierung eingesetzt. Eine Liste aller eingesetzten Oligonukleotide ist im Anhang aufgeführt.

2.1.4 Plasmide

Die Two-Hybrid Vektoren pBTM116 und pVP16 wie auch die Kontrollplasmide pBTM116-RPGR, pVP16-PDE und die embryonale Maus Two-Hybrid Bibliothek wurden von der Arbeitsgruppe Jörg Becker (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt. Das komplette System wurde von Stanley M. Hollenberg (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington) entwickelt. Für die Expression in *E.coli* wurden die Vektoren pMAL-c2-Thrombin (NEB, Schwalbach modifiziert von Christoph Block, MPI für mol. Phys., Dortmund) und pGEX-4T3 (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Als primärer Klonierungsvektor wurde pCMV-SPORT3 verwendet (Gibco BRL, Karlsruhe). pBluescript BS(+) (Stratagene, Amsterdam) und pCR3.1 (Invitrogen, Groningen) wurden für Standardklonierungen von PCR-Fragmenten verwendet. Für die eukaryotische Expression von NaPi-IIa wurde der Vektor pCDNA3 (Invitrogen) verwendet.

2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Standardlösungen, -medien und -puffer wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt.

Medien und Lösungen für die Hefetransformation:

Yc-Medium:

Auf 1 Liter Wasser:

1.2g yeast nitrogen base, 5g Ammoniumsulfat, 10g Bernsteinsäure und 6g Natriumhydroxid

supplementiert mit:

je 0.1g Adenin, Arginin, Cystein, Threonin, (*Leucin*) = *L*, (*Lysin*) = *Ly*, (*Tryptophan*) = *T* und (*Uracil*) = *U*

je 0.05g Aspartat, (*Histidin*) = *H*, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin

Für die entsprechenden Minimalmedien wurden die hervorgehobenen Bestandteile aus dem Medium entfernt.

YPD-Medium:

Auf 1 Liter Wasser:

10g Hefeextrakt, 20g Pepton und 20g Glucose

YPAD-Medium:

Auf 1 Liter Wasser

10g Hefeextrakt, 20g Pepton, 0.1g Adenin und 20g Glucose

Zur Herstellung von Platten wurden 20g Agar pro Liter des entsprechenden Mediums zugefügt.

LiAc/TE:

100mM Lithiumacetat, 10mM Tris/HCl pH 7.5, 1mM EDTA

PEG/LiAc/TE:

40% Polyethylenglykol 3350, 100mM Lithiumacetat, 10mM Tris/HCl pH 7.5, 1mM EDTA

2.2 Zellsysteme

2.2.1 Bakterienstämme

E. coli DH 10B (Gibco BRL, Karlsruhe): F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*dlacZ*ΔM15 Δ*lacX74*
deoR recR recA1 endA1 araD139 Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK*
λ⁻ *rpsL nupG*

E. coli BL21 (NEB, Schwalbach): F⁻ *ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B*

E. coli HB101 (NEB): F⁻ Δ(*gpt-proAB*) *rpsL* (Str^r) [φ80*dlacZ*Δ(*lacZ*)M15]*thi*

E. coli SCS110 (NEB): *rpsL* (Str^r) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam*
dcm supE44 Δ(*lac-proAB*) [F⁺ *traD36 proAB lacI^qZ*ΔM15]

2.2.2 Hefestämme

L40 (Vojtek, 1993): *MATa his3*Δ200 *trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::*(4*lexAop-HIS3*)*URA3::*(8*lexAop-lacZ*)*GAL4*

2.2.3 Säugerzellen

Epitheliale Zellen aus dem proximalen Tubulus der Beutelratte (Opossum Kidney Zellen, OK-Zellen) wurden von ATTC (Rockville) bezogen.

2.3 Instrumentation

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde mit einem OmniGene Temperatur Cycler mit Deckelheizung und "intube"-Temperaturkontrolle der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde durch Elektroporation mit dem Gene Pulser der Firma Biorad (München) durchgeführt. Zum Zellaufschluß wurde das Ultraschallgerät der Firma Branson Sonic Power Co. (Vertrieb durch die Firma Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) verwendet. Die Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen erfolgte mit dem Gene-Quant der Firma Pharmacia (Freiburg). Messungen von Extinktionen mit sichtbarem Licht wurden mit einem Spektralphotometer (Spectronic 601, Milton Roy, Rochester) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden DNA-Fragmente im PCR-Maßstab mit fluoreszenzmarkierten "Big Dye"-Nucleotiden gebildet und auf einem Perkin Elmer (Weiterstadt) DNA-Sequenzierungsgerät analysiert. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen wurde eine Mighty-Small II SE 250 Elektrophoreseeinheit von Hoefer (Heidelberg) verwendet. Der Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen erfolgte mit dem Tankblotsystem der Firma Hoefer. OK-Zellen wurden in einem Inkubator der Firma Forma Scientific (Nürtingen) kultiviert. Die immunhistochemischen Untersuchungen der OK-Zellen wurden an einem konfokalen Mikroskop TE 200 der Firma Nikon (Japan) durchgeführt. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde ein 488nm Omnicrome Laser und ein 532nm Coherent Laser der Firma Chino (Santa Clara, USA). Nicht-konfokale Bilder von Gewebeschnitten wurden mit dem Zeiss Axiophot (Oberkochen) oder dem Mikroskop TE-200 von Nikon (Japan) aufgenommen.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Techniken

Sofern nicht anders erwähnt, wurden molekulargenetische Methoden nach Sambrook et al. (1989) angewandt.

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA für die nicht-radioaktive Sequenzierung mit BigDye Dideoxy Nukleotiden und für präparative Zwecke erfolgte nach dem Plasmid- oder Qiaprep Spin-Protokoll (Qiagen, Hilden). Für die Transfektion der OK-Zellen wurden endotoxinfreie Plasmide mit dem Endofree Plasmid Kit (Qiagen, Hilden) hergestellt.

3.1.2 Klonierungstechniken

Die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die nach der Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch über Agarosegele getrennt, die DNA-Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) eluiert. In den Ligationsansatz wurden ca. 100ng der Vektor-DNA und ein dreifacher molarer Überschuß an Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 2h bei Raumtemperatur oder für 24h bei 14°C in einem Volumen von 20µl. Anschließend wurde die DNA mit 5µl Hefe t-RNA (1µg/µl), 12.5µl 7.5M NH₄OAc und 70µl 96% Ethanol (-20°C), präzipitiert und zur Transformation eingesetzt. Die Herstellung elektrokompetenter *E.coli* DH10B Zellen und deren Transformation mit rekombinanter DNA durch Elektroporation wurde nach der Methode von Dower et al. (1988) durchgeführt. Ein Drittel des Ligationsansatzes wurde mit 70µl der Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation erfolgte bei einem Puls von 1,8kV, 200 Ω und 25 µF. Die transformierten Zellen wurden sofort in 1ml LB-Medium suspendiert und 1h zur Regeneration bei 37°C inkubiert. Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert.

3.1.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Synthese von PCR-Fragmenten erfolgte nach den von Innis et al. (1990) beschriebenen Grundlagen. Für analytische Zwecke wurde die *Taq* DNA Polymerase (Sigma, Steinheim) verwendet. Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten wurde Advantage 2 *Taq* DNA Polymerase (Clontech, Heidelberg), *rTth* DNA Polymerase, XL (Perkin Elmer, Weiterstedt) oder die *Pfx* DNA Polymerase (GibcoBRL, Karlsruhe) eingesetzt, welche aufgrund der 3'→5'-Exonukleaseaktivität eine höhere Genauigkeit beim Einbau der Nukleotide gewährleisten. Reaktionen mit der *rTth* DNA Polymerase XL wurden mit einem manuellen "hot start" durchgeführt, um unspezifische Amplifizierung bei niedrigen Temperaturen zu vermeiden. Da die Advantage 2 *Taq* DNA Polymerase und die *Pfx* DNA Polymerase mit einem hitzelabilen "hot start"-Antikörper deaktiviert wurde, entfällt dieser Schritt für diese Enzyme.

3.1.4 Amplifikation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Überprüfung auf transformierte *E.coli* Zellen erfolgte mittels PCR. Wenige Zellen von Bakterienkolonien wurden in ein PCR-Gefäß überführt und durch Einwirkung von Mikrowellen-Strahlung (2min/600 Watt) aufgeschlossen. Zur Amplifikation der subklonierten DNA wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt. Die modifizierte PCR-Reaktion wurde bei geeigneter Schmelztemperatur der Primer durchgeführt.

Reaktionsansatz:

aufgeschlossene Bakterienzellen +	1,25µl 10 x PCR-Puffer(Sigma)
	0,25µl antisense-Primer (10µM)
	0,25µl sense-Primer (10µM)
	1,00µl dNTP-Mix (je 2,5mM)
	0,10µl <i>Taq</i> Polymerase (5U/µl)
	9,65µl Wasser

3.1.5 Einführung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (Step-up PCR)

Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, in welcher die sequenzhomologen Primer um die Nukleotidsequenz des Erkennungsmotives für die gewünschte Restriktionsendonuklease ergänzt waren. Die ersten 5 Zyklen wurden bei einer Anlagerungstemperatur durchgeführt, welche dem sequenzhomologen Bereich des Primers entspricht. In den restlichen Zyklen wurde die Schmelztemperatur des vollständigen Primers verwendet.

3.1.6 Sequenzierung

Nichtradioaktive Sequenzierungen wurden mit dem PRISM Ready Reaction BigDye Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit nach den Angaben der Firma Perkin Elmer (Weiterstedt) durchgeführt. Der Sequenzierungszyklus wurde bezüglich der Anlagerungstemperatur auf die Schmelztemperatur der Primer abgestimmt. Die Zyklen wurden wie folgt durchgeführt: 10s bei 96°C, 5s \geq 50°C und 4 min bei 60°C für 25 Zyklen. Die Reaktionsprodukte wurden mit Ethanol unter Zugabe von 0.3M Natriumacetat pH 4.6 und Dextran-Blau gefällt.

3.1.7 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Die reverse Transkription von RNA wurde mit Hilfe der Avian Moloney Virus Reversen Transkriptase (AMV-RT) von Promega (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template wurde totale RNA aus Niere bzw. Leber der Maus mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die reverse Transkription erfolgte für 1h bei 42°C. 1/10 des Ansatzes wurde für die Amplifikation des Zielgens eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Experiment ohne reverse Transkriptase durchgeführt, um eine mögliche Kontamination mit Plasmid DNA oder genomischer DNA auszuschließen. Die Zyklen der PCR waren wie folgt: 4 Zyklen mit 30s bei 94°C, 2 min bei 75°C und 34 Zyklen mit 30s bei 94°C, 2 min bei 70°C.

3.1.8 Sequenzanalysen

Alle Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme des GCG Sequence Analysis Software Package Vers. 8.0 (Genetics Computer Group, Madison, USA) und mit Hilfe von internetbasierenden Sequenzanalyseprogrammen analysiert (Webcutter, Clustal 1.2, Blast, Fasta).

3.2 Immunologische Techniken

In den folgenden Abschnitten sind die Methoden zur Herstellung und Beurteilung des verwendeten Antikörpers gegen das Protein C160 zusammengefaßt.

3.2.1 Herstellung des Antikörpers (Biotrend, Köln)

Durch Injektion eines an KLH gekoppelten Peptids ($\text{NH}_2\text{-RHETREDRTKRLFRG-CONH}_2$) wurden zwei Kaninchen immunisiert, um Antikörper gegen das Protein C160 zu bilden. Die Tiere wurden nach dem folgenden Schema geboostet:

Tag 0	Präimmunserum-Entnahme 1.5 ml/Immunsierung
Tag 7	1.Boost
Tag 14	2.Boost
Tag 28	3.Boost
Tag 35	1.Blutentnahme 20ml
Tag 56	4.Boost
Tag 63	2.Blutentnahme 25ml
Tag 98	entbluten 55ml

20ml von dem Serum aus der zweiten Blutentnahme wurden über Affinitätschromatographie mit Hilfe des Peptids aufgereinigt. Die Endkonzentration des verwendeten, aufgereinigten Antikörpers beträgt 0.9 µg/µl.

Die Reaktivität des Antikörpers wurde über einen Dot-Blot getestet und mit der Reaktivität des Präimmunserums verglichen. Jeweils 50ng Antigen oder Kontrollprotein wurden auf einer Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel) immobilisiert und 1h mit Blocklösung (Boehringer Mannheim) inkubiert. Die Membrane wurden mit dem Primärantikörper in Blocklösung 1h inkubiert. Nach 3x waschen mit Blocklösung für 15min wurden die Membrane mit

einem anti-Kaninchen alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000) versetzt. Nach drei weiteren Waschschritten wurde der gebundene Sekundärantikörper durch eine Farbreaktion mit BCIP/NBT (Promega) detektiert.

3.2.2 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots können Proteine durch einen Antikörper identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die Naßkammer Technik angewendet. Zuerst wurden Proteinpräparationen über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (10%, Schaeffer 1987). Nachfolgend wurden die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schuell) transferiert (3h bei 150V nach Towbin, 1979). Die Membran wurde analog zu einem Protokoll von Lederer et al. (1997) mit primären und sekundären Antikörpern behandelt. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte entweder mit dem ECL-Kit (Amersham) oder mit der Färbelösung BCIP/NBT. Die Reaktionen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

3.2.3 Immunhistochemie an OK-Zellen

Die Immunfluoreszenz-Versuche wurden nach einem modifizierten Protokoll von Pfister et al. (1998) durchgeführt. Auf Deckgläsern gewachsene OK-Zellen wurden mit 1x PBS + 0.5 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ gewaschen und mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert (10 min bei RT). Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS /20 mM Glycin wurden die Zellen 30 min bei RT mit 1x PBS/0.1% Saponin permeabilisiert. Der primäre Antikörper wurde 1h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Farbstoff Cy3, 1h RT Inkubation).

3.2.4 Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Die untersuchten Organe wurden narkotisierten Tieren entnommen. Das Gewebe wurden durch Inkubation in 3% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Präparaten wurden 4-6µm dicke Schnitte angefertigt, welche nach Rehydratation (je 2min in 100%, 96%, 90%, 70% und 50% Alkohol) mit 10% Ziegennormalserum geblockt wurden. Für den Antikörper 2426 wurde vorher eine Behandlung mit 0.2N NaOH (10min) zur Demaskierung des Antigens durchgeführt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht in PBS+3% BSA (4°C). Der sekundäre Antikörper wurde analog 30min bei RT inkubiert. Zwischen allen Inkubationschritten

wurden die Präparate mit PBS gewaschen. Zur Kernfärbung wurde im letzten Inkubationsschritt 1µg/ml DAPI zugesetzt.

Die Experimente mit Gefrierschnitten wurden analog durchgeführt. Hier entfällt jedoch die Einbettung in Paraffin und die Rehydratationsprozedur. Statt dessen wurde das fixierte Gewebe direkt in flüssigem Stickstoff oder Propan eingefroren und im Kryostat geschnitten. In den Experimenten zur Lokalisation von Shank3b in der Mäuseniere und in der menschlichen Niere wurde statt der Perfusionsfixierung eine äußere Fixierung in 3% Paraformaldehyd/PBS durchgeführt.

3.3 Two-Hybrid Screen

Die Interaktionsklonierung wurde mit Hilfe eines auf dem LexA-Transkriptionsfaktor basierendem Two-Hybrid System in Hefe durchgeführt. Als Köderprotein wurde der C-Terminus des Na⁺/Phosphat Kotransporters verwendet. Dieses wurde in den Vektor pBTM116 im Leserahmen zu der DNA-bindenden LexA Domäne fusioniert und in dem Reporterstamm L40 exprimiert.

3.3.1 Transformation des Reporterstamms L40

Zur Transformation des Hefestamms L40 mit einem einzelnen Plasmid wurde die LiAc-Methode nach Gietz und Woods (1994) angewendet. Das Plasmid pBTM116 enthält das TRP1-Gen zur Selektion auf tryptophanfreiem Medium und das Plasmid pVP16 enthält das LEU2-Gen für die Selektion auf leucinfreiem Medium. Yc/-UTLy-Agarplatten wurden in Einzeltransformationen mit pBTM116-basierenden Plasmiden verwendet. Doppeltransformierte Zellen mit pBTM166- und pVP16-basierenden Plasmiden wurden auf Yc/-UTL-Agarplatten selektiert. Zur Selektion auf eine Interaktion der Fusionsproteine wurden Yc/-THULLy-Agarplatten verwendet.

3.3.2 Transformation der Two-Hybrid Bibliothek

Für die Transformation der Bibliothek wurde ein modifiziertes Protokoll nach Vojtek et al (1993) verwendet. Die L40 Zellen wurden nach der Transformation mit dem Köderplasmid in 10ml UTLY-Medium über Nacht inkubiert. Diese Startkultur wurde in 100ml UTLY-Medium eine weitere Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurde mit dieser Kultur ein Liter YPAD-Medium angeimpft und bis zu einer OD von 0.4 bei 30°C inkubiert (ca. 4h). Die Zellen wurden mit 1000xg (RT) 10min zentrifugiert und in 400ml TE-Puffer suspendiert. Hiernach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 30ml LiAc/TE suspendiert, nochmals zentrifugiert und schließlich in einem Gesamtvolumen von 8ml LiAc/TE suspendiert. Zu dieser Suspension wurden 2ml DNA-Mixtur (10µg/µl denaturierter einzelsträngiger DNA und 300µg Bibliothek-Plasmid) pipetiert und mit je 50ml PEG/LiAc/TE versetzt. Nach 30min Inkubation bei 30°C wurden 6.6ml DMSO zugefügt. Nach 20min bei 42°C wurden die Zellen auf Eis gekühlt, 10min zentrifugiert, mit 30 ml YPD gewaschen und in 400ml YPD resuspendiert. Nach 1h Inkubation zur Regeneration bei 30°C wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit 20ml TE-Puffer gewaschen und in 30ml TE resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in 300µl Aliquots zur Selektion auf Protein-Protein Interaktionen auf Yc/-THULLY-Agarplatten ausplattiert.

3.4 Library Screening

Das Screening der Mäusenieren cDNA Bibliothek wurde mit Hilfe eines PCR Protokolls durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Grundlage eines Protokolls von Munroe et. al (1995), welches für den Screen einer Phagenbibliothek verwendet wurde. 200.000 Bakterienklone der Bibliothek wurden hierfür pro Nylonmembran (Durchmesser=12cm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den Filtern wurden drei Replikafilter angefertigt. Die Kolonien dieses Replikafilters wurden komplett in 2ml LB-Medium suspendiert. Die zwei weiteren Filter wurden in 1cm breite Längs- bzw. Querstreifen zerschnitten. Die entsprechenden Untermengen der Bibliothek wurden hierauf in 1ml LB-Medium suspendiert. Zur Lokalisation des gesuchten Klons wurden zunächst je 2µl der Bakteriensuspension der vollständigen Filter mittels PCR analysiert (1x 94°C 30s denaturieren, 4x 94°C 30s, 75°C 2min und 34x 94°C 30s, 70°C 2min). Von einem als positiv identifizierten Filter wurden danach die jeweiligen Untermengen aus den Längs- bzw. Querstreifen der Replikafilter analog untersucht. Durch Kreuzung der positiven Streifen konnte die Lokalisation des Klons auf eine 1cm² große Fläche auf dem Originalfilter reduziert werden. Der gesuchte Klon wurde hiernach durch Entnehmen kleiner Bakterienmengen aus diesem Bereich und nachfolgender PCR-Analyse weiter eingekreist. Der endgültige Klon wurde durch vereinzelnde Ausplattierung eines deutlich positiven Bakterienpools erhalten.

3.5 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Zur Amplifizierung des 5'-Bereichs von cDNA wurden zwei verschiedene Varianten der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) verwendet. Zuerst wurde homopolymeres Tailing mit Hilfe des RACE-Kits von GibcoBRL (Karlsruhe) durchgeführt. Zusätzlich wurde das SMART-Kit von Clontech (Heidelberg) verwendet, welches eine höhere Spezifität der Reaktion ermöglicht. Beide Methoden basieren auf einer PCR-Reaktion mit einem genspezifischen Primer und einem Standardprimer, welcher homolog zu einer an das 5'-Ende aller cDNAs angefügten Sequenz ist.

3.5.1 Homopolymeres Tailing

Diese Variante wurde nach den Vorgaben des GibcoBRL-Protokolls durchgeführt. Aus der Mäuseniere wurde totale RNA mit Hilfe des Rneasy-Kits von Qiagen (Hilden) hergestellt. Hieraus wurde mit Hilfe einer Oligo-dT-Sepharosesäule mRNA isoliert. Für die RACE wurden zunächst 0.1µg dieser mRNA in einer reversen Transkription 1h mit Hilfe der Superscript II RT und einem genspezifischen Primer (GSP1) in cDNA kopiert. Überschüssige RNA wurde mit RNase H und RNase T1 entfernt und die cDNA wurde durch Bindung an GlassMAX DNA-Säulen aufgereinigt. Einem Fünftel der cDNA wurde ein Poly-Deoxycytosin-Schwanz mit Hilfe einer terminalen Transferase an das 5'-Ende angehängt. Anschließend wurde die gesuchte cDNA durch einen zweiten verschachtelten genspezifischen Primer (GSP2) und einen Poly-Deoxyguanin-Adapterprimer bei Standardbedingungen mittels PCR amplifiziert (1x 94°C 1min denaturieren, 6x 94°C 15sec, 70°C 2min und 35x 94°C 15sec, 65°C 2min – 1/5 der "getailten" cDNA/Reaktion).

3.5.2 SMART-Variante (Switch Mechanism at the 5' end of RNA Templates)

Diese Methode nutzt die Eigenschaft reverser Transkriptasen aus, von einem RNA-Template auf ein DNA-Template wechseln zu können. Da die reverse Transkriptase eine schwache terminale Transferaseaktivität besitzt, werden in einer Reaktion einige Nucleotide an das 5'-Ende der cDNA angehängt. Durch diese Aktivität werden unter Standardbedingungen etwa drei Deoxycytosinmoleküle angehängt. Dieser Überhang kann mit einem zusätzlich zugefügten Adapterprimer wechselwirken. Da die reverse Transkriptase an dieser Stelle von der RNA zur DNA des Adapterprimers wechseln kann, wird der cDNA die bekannte komplementäre Sequenz angefügt. Diese Variante hat gegenüber dem homopolymeren Tailing den Vorteil, daß die Adaptersequenz nur am 5'-Ende einer cDNA angefügt werden kann.

Die Reaktion wurde nach dem Protokoll von Clontech durchgeführt. 0.2µg mRNA wurden mit einem Poly-dT-Primer in Gegenwart des SMART II-Oligos 1.5h mit Superscript II RT revers transkribiert. Der Ansatz wurde in 250µl Tricin-EDTA-Puffer verdünnt und jeweils 2.5µl wurden direkt zur PCR mit *rTth* Polymerase XL (Perkin Elmer) eingesetzt (5x 94°C 5s, 72°C 4min 5x 94°C 5s, 70°C 10s, 72°C 4min und 35-40x 94°C 5s, 68°C 10s, 72°C 4min).

3.6 Bestimmung der Gewebeverteilung

Die Expression spezifischer mRNA wurde in verschiedenen Geweben über einen cDNA Panel und ergänzend durch einen Northern-Blot bestimmt.

3.6.1 PCR mit einem MTC cDNA-Panel

Der MTC cDNA-Panel von Clontech besteht aus 12 cDNA Proben von verschiedenen Geweben der Maus. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Untersuchung der Expression einer bestimmten cDNA wurden die Proben mittels PCR unter Standardbedingungen amplifiziert (4x 94°C 30s, 75°C 2min und 34x 94°C 30s, 70°C 2min). Zur Erhöhung der Spezifität der Reaktion wurden die ersten Schritte bei einer höheren Schmelztemperatur durchgeführt (Touch-down PCR).

3.6.2 Northern Blot Analyse

Der Northern Blot dient zur Längenbestimmung von mRNA Transkripten. Zunächst wurde totale RNA aus dem Mäusenierenkortex mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Aus der totalen RNA wurde durch zweifache Aufreinigung mittels Oligo(dT)-Cellulose mRNA gewonnen. 2µg mRNA wurden durch denaturierende Gelelektrophorese (1% Agarose, Formaldehyd in Gel und Laufpuffer) aufgetrennt. Das Gel wurde 30min mit NaOH behandelt und über Nacht mit 20x SSC auf eine Nylonmembran (Boehringer Mannheim) geblottet. Die RNA wurde durch Hitze fixiert (30min 120°C). Zur Detektion wurde eine radioaktive, zu C160 komplementäre RNA-Sonde durch *in vitro* Transkription des linearisierten Plasmids pC160-3' mit der SP6-Polymerase (Promega) hergestellt. Die Membran wurde mit dieser Sonde über Nacht in DIG Easy Hyb Puffer (Boehringer Mannheim) bei 60°C inkubiert ($1.6 \cdot 10^6$ cpm/ml), zweimal mit 2xSSC/0.1% SDS (1x 15min, 1x 30min/60°C) und dreimal mit 0.5xSSC/0.1% SDS (30min/60°C) gewaschen. Die Membran wurde 3 Tage auf einem photographischen Film (Kodak) exponiert.

3.7 Expressionssystem *Escherichia coli*

Das gewählte Expressionssystem aus *E.coli* BL21 und dem Plasmid pMAL-c2-Thrombin ermöglicht die Translation eines Zielproteins fusioniert mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) von *E.coli*. Analog hierzu kann ein Protein mit Hilfe des Plasmids pGEX-4T3 mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* fusioniert werden. Die Klonierung des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgt in den offenen Leserahmen der Sequenz für das Fusionsprotein. Das Fusionskonstrukt steht in diesen Vektoren unter der Kontrolle des starken tac Promotors, der mit Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben aus dem Handbuch zum GST-Gene Fusion System der Firma Pharmacia (Freiburg).

3.7.1 Proteinexpression in *E. coli* und Affinitätschromatographie

Transformierte *E. coli* BL21 Zellen wurden aerob in LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0.5 angezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression mit 0.3mM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte für weitere 4h bei 30°C. Durch Zentrifugation bei 7000xg wurden die Zellen sedimentiert und in je 100ml phosphatgepufferter Salzlösung (1xPBS) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Einwirkung kurzer Ultraschallpulse aufgeschlossen (5min Stufe 8), die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 9000xg entfernt (unlösliche Fraktion) und der Überstand (lösliche Fraktion) wurde auf die mit Säulenpuffer äquilibrierte Chromatographiesäule geladen. Für die Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins wurde hierfür eine Amylosesäule und für das GST-Fusionsprotein eine Glutathion-Sepharosesäule verwendet. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit je 30ml 1xPBS entfernt und das Fusionsprotein wurde mit 10ml 1xPBS + 10mM Maltose (MBP-Fusionsprotein) oder 10ml 1xPBS + 10mM reduziertem Glutathion (GST-Fusionsproteine) in 0.5ml Fraktionen eluiert.

3.7.2 Blot-Overlay

Zur Abschätzung der Affinität der Interaktion zwischen zwei Fusionsproteinen wurde die Blot-Overlay Technik verwendet. Diese Technik ist dem Western-Blot sehr ähnlich. Es wurden ca. 2.2ng des GST Fusionsproteins nach SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (Schägger) auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Blot wurde in kleine Abschnitte zerlegt und mit Blockpuffer (1%

BSA in TBS) inkubiert. Hierauf wurden die Membrane mit verschiedenen Konzentrationen (0.1-20nM) des MBP Fusionsproteins in Blockpuffer für 1h versetzt und 3x mit Blockpuffer gewaschen. Die Membrane wurden mit einem Maus Antikörper gegen MBP (1:2000) 1h inkubiert und erneut 3x gewaschen. Hiernach wurden die Membrane mit einem sekundären alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Maus Antikörper (1:2000) 1h inkubiert und nochmals 3x gewaschen. Die gebundenen Komplexe von MBP-Fusionsprotein, anti-MBP Antikörper und alkalische Phosphatase gekoppeltem sekundären Antikörper wurden durch eine Farbreaktion mit BCIP/NBT detektiert.

3.8 Expressionssystem Opossum Kidney-Zellen (OK-Zellen)

OK-Zellen (Opossum Kidney-Zellen, ATTC) entstammen dem proximalen Tubulus der Opossumniere. Diese Zelllinie zeigt die Merkmale von Epithelzellen (apikale/basolaterale Membranen) und bildet eine dichte Einzelzellschicht aus. Sie besitzt funktionelle Eigenschaften des proximalen Tubulus und wird häufig als Modellsystem verwendet. Insbesondere wurde mit diesem Zellsystem die Expression und Regulation des Na⁺/Phosphat Kotransporters vom Typ IIa untersucht.

3.8.1 Zellaufzucht und Zellkultur

OK-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm²) in Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) mit 4.5 % D-Glucose, 2 mM L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum bei 37 °C und 5 % CO₂ angezogen. Für die Präparation wurden sie mit einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/cm² in Petrischalen von 10 cm Durchmesser und für die Transfektion mit einer Dichte von 2x10⁵ Zellen/cm² in Mehrlochplatten oder auf polylysinbeschichteten Deckgläser ausgesät.

3.8.2 Membranpräparation

Die Präparation erfolgte nach einer von Lin et al. (1998) beschriebenen Methode. Die OK-Zellen wurden durch "freeze/thaw"-Zyklen aufgeschlossen und durch differenzielle Zentrifugation in drei Fraktionen aufgeteilt: Eine Kernfraktion, welche ausserdem schwere Zelltrümmer enthält, eine cytosolische Fraktion und eine Plasmamembranfraktion.

3.8.3 Transfektion

Die transiente Transfektion wurde mit Effectene Transfektion-Reagenz der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode wird die DNA in den Nukleus der Zelle eingeführt ohne in den Chromosomen integriert zu werden. Die Transkription der transfizierten Gene kann 24-96 Stunden nach der Einführung der DNA analysiert werden. Für diese Experimente wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen /cm² in Mehrlochplatten oder auf polylysinbeschichteten Deckgläsern ausgesät (pro Loch 5 ml Kulturmedium) und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Tranfektionseffizienz wurde das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) verwendet. Durch Transfektion des Plasmids pEGFP-C1 (Clontech) wird dieses stark grün fluoreszierende Protein in den Zellen exprimiert. Durch die Untersuchung eines Parallelansatzes unter einem Fluoreszenzmikroskop läßt sich somit der Anteil von transfizierten Zellen abschätzen.

3.9 Membranpräparationen aus tierischem Gewebe

3.9.1 Präparation von Bürstensaumvesikeln aus der Mäuseniere

Die Bürstensaummembranfraktion aus Rindengewebe der Mäuseniere wurde nach dem Prinzip der differentiellen Präzipitation, wie von Booth and Kenny (1974) beschrieben, unter Verwendung von MgCl₂ gewonnen. Mit einer Rasierklinge wurde die Rinde in sehr dünnen Scheiben von der Niere abgetrennt, gewogen und im Waringblendor für 2x30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Dieser Schritt und alle folgenden wurden bei 4°C durchgeführt. Danach wurde das Homogenat durch eine dreilagige Mullschicht passiert, um nicht aufgeschlossene Gewebepartikel zu entfernen. Dieses Homogenat wurde mit 1M MgCl₂ in einem Verhältnis versetzt, welches eine Endkonzentration von 5 mM ergibt. Diese Mischung wurde für 15 Minuten sanft gerührt und dann für 12 Minuten bei 1.500xg zentrifugiert. In diesem niedrigtourigen Zentrifugationsschritt werden neben nicht aufgeschlossenen Epithelien, Kerne und die durch Vernetzung über Mg²⁺-Ionen aggregierten basolateralen Membranen entfernt. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde für 20 Minuten bei 16.000xg zentrifugiert und das Pellet wurde in einem kleinen Volumen Vesikelpuffer (200 mM Mannitol, 20 mM HEPES, pH 7.4 mit Tris) aufgenommen und über eine Spritze mit einer Kanüle von 26G homogenisiert. In dieser mit apikalen Membranen angereicherten Membranfraktion und in einem Aliquot des Homogenates wurden der Proteingehalt und die Aktivität der Leitenzyme für die apikale Membran (alkalische Phosphatase) und für die basolaterale Membran (Na⁺,K⁺-ATPase) bestimmt:

	Alkalische Phosphatase	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase
Homogenat	22.29 +/- 1.76	4.27 +/- 0.41
Bürstensaummembranfraktion	252.52 +/- 4.01 (11.3)	4.95 +/- 0.37 (1.16)

Die Enzymaktivitäten sind in $\mu\text{Mol/h}$ bezogen auf 1mg Protein angegeben. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n=3$). Die Werte in Klammern stellen den jeweiligen Anreicherungsfaktor dar.

3.9.2 Präparation von Plasmamembranen aus der Rattenniere

Die Plasmamembranfraktion wurde mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation aus Rindengewebe der Rattenniere gewonnen. Dazu wurde das Gewebehomogenat, das genauso gewonnen wurde, wie für das Rindengewebe der Mäuseniere beschrieben, zunächst für 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Epithelien zu entfernen. Danach erfolgte die 1. Zentrifugation für 20 Minuten bei 16.000xg. Es entsteht ein mehrschichtiges Sediment; unten sammeln sich die Kerne, darüber die Mitochondrien und darauf liegt, als sog. "fluffy layer" die Schicht der Plasmamembranen. Diese lassen sich von dem fester gepackten Sediment der Kerne und der Mitochondrien abschwenken. Durch eine Wiederholung dieses Zentrifugationsschrittes bei 16.000xg wurden apikale und basolaterale Membranen angereichert, während der Anteil an Mitochondrien vermindert wurde.

	Alkalische Phosphatase	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase
Homogenat	18.46 +/- 1.07	4.82 +/- 0.48
Bürstensaummembranfraktion	118.14 +/- 3.67 (6.4)	20.71 +/- 2.32 (4.3)

Die Enzymaktivitäten sind in $\mu\text{Mol/h}$ bezogen auf 1mg Protein angegeben. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n=3$). Die Werte in Klammern stellen den jeweiligen Anreicherungsfaktor dar.

4 Ergebnisse

4.1 Two-Hybrid Screen

Um Interaktionspartner des Na⁺/Phosphat Kotransporters zu identifizieren, wurde ein Two-Hybrid Screen in Hefe durchgeführt. In Abb. 4 ist das Prinzip des Two-Hybrid Systems skizziert. In dem verwendeten System wird ein "Köder"-Protein mit der DNA-bindenden LexA Domäne fusioniert und in dem Reporterstamm L40 exprimiert. Dieser Stamm besitzt ein HIS3-Reportergen, welches im Promotor LexA Bindungsstellen enthält. Durch die Fusion mit der DNA-bindenden Domäne wird das "Köder"-Protein hiermit in die direkte Nähe des Reportergens lokalisiert. Der transformierte Stamm wird dann mit einer cDNA-Bibliothek ("Beute") kotransformiert. Diese Bibliothek kodiert für $3 \cdot 10^7$ unabhängige Proteindomänen, welche mit der transkriptionsaktivierenden VP16-Domäne fusioniert sind. Eine Interaktion der beiden Fusionsproteine in dem L40 Reporterstamm führt hierdurch zur Aktivierung des HIS3 Gens. Durch die Verwendung von Minimalmedium kann auf Transformanten selektiert werden, welche das Reportergen aktivieren und somit eine Interaktion der Fusionsproteine aufweisen.

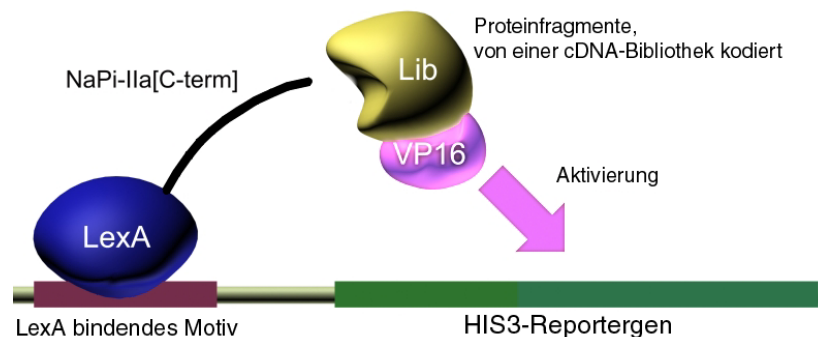


Abb 4: Prinzip des Two-Hybrid Systems

Durch die Topologieuntersuchungen von Kohl et. al (1996) wurde bereits experimentell gezeigt, daß die C-terminale Domäne des Transporters intrazellulär lokalisiert ist. Zusammen mit der hohen Sequenzhomologie zu einem PDZ-Domänen bindenden Motiv im C-Terminus des Proteins lag die Vermutung nahe, daß eine solche Domäne in einem interagierenden Protein vorhanden ist. Aus diesen Gründen wurde der C-Terminus des Transporters als Köder verwendet. In einem Two-Hybrid Screen ist besonders zu beachten, daß große Proteine nicht in den Kern transportiert werden können, wo sie das Reportergen zur Identifikation der Interaktion aktivieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde als Beute eine Bibliothek verwendet, welche Proteinabschnitte einer geringen Größe von etwa 100 Aminosäuren enthält. Da die PDZ-Domäne eine entsprechende

Größe besitzt, kann sie in einem Screen mit dieser Bibliothek identifiziert werden. Als Kontrolle wurde der Retinitis Pigmentosa G-Protein Regulator (RPGR) sowie leeres Plasmid verwendet. Der C-Terminus des Zebrafischs, welcher ein leicht modifiziertes Motiv besitzt, wurde ebenfalls auf eine Interaktion mit identifizierten Proteinen untersucht. Durch den Screen konnten drei PDZ-Domänen von verschiedenen Proteinen identifiziert werden. Die Domäne mit der deutlichsten Aktivierung des Reportergens wurde näher untersucht.

4.1.1 Konstruktion der Ködervektoren pCMLexA und pCZFLexA

Die letzten 76 Aminosäuren des Na⁺/Phosphat Kotransporters der Maus und die letzten 92 Aminosäuren des Na⁺/Phosphat Kotransporters aus dem Zebrafisch wurden aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen als C-terminale Domänen definiert. Zur Konstruktion der Plasmide wurde dieser Bereich zwischen die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* des Vektors pBTM116 eingefügt. Hierdurch wurden zwei Plasmide erhalten: pCMLexA (Maus) und pCZFLexA (Zebrafisch).

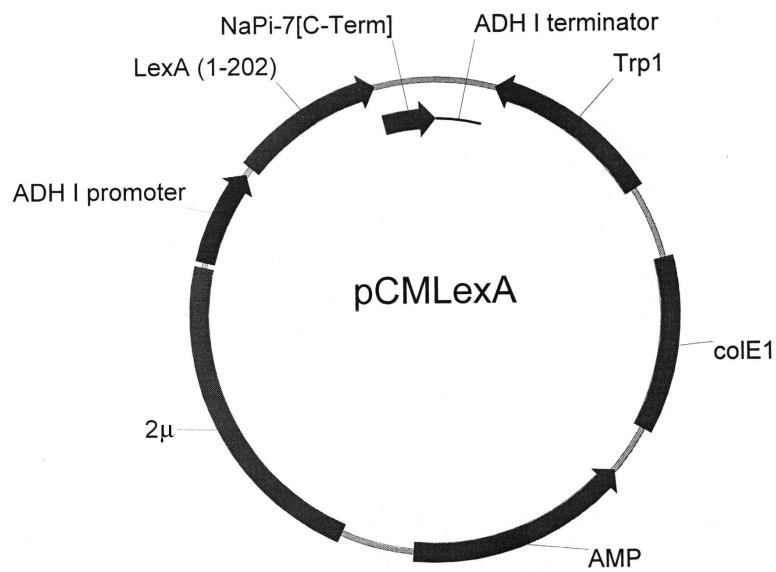


Abb. 5: Plasmidkarte des Vektors pCMLexA. Das Plasmid pCZFLexA ist analog aufgebaut.

4.1.2 Bestimmung der Selbstaktivierung des Reportergens

Es wird häufig beobachtet, daß bestimmte Sequenzen nach der Fusion an die DNA-bindende LexA-Domäne das Reportergen ohne einen Bindungspartner aktivieren. Um diese Selbstaktivierung zu verhindern, wurde der Reportergeninhibitor 3-Aminotriazol (ATZ) in einer Konzentration von 25 mM zu THULLy-Selektionsagarplatten zugefügt. Abb. 6 demonstriert das Wachstum von kotransformierten Hefezellen, welche den C-Terminus des Maustransporters zusammen mit einem leeren Beute-Plasmid enthalten, sowie die entsprechenden positiven und negativen Kontrollen.

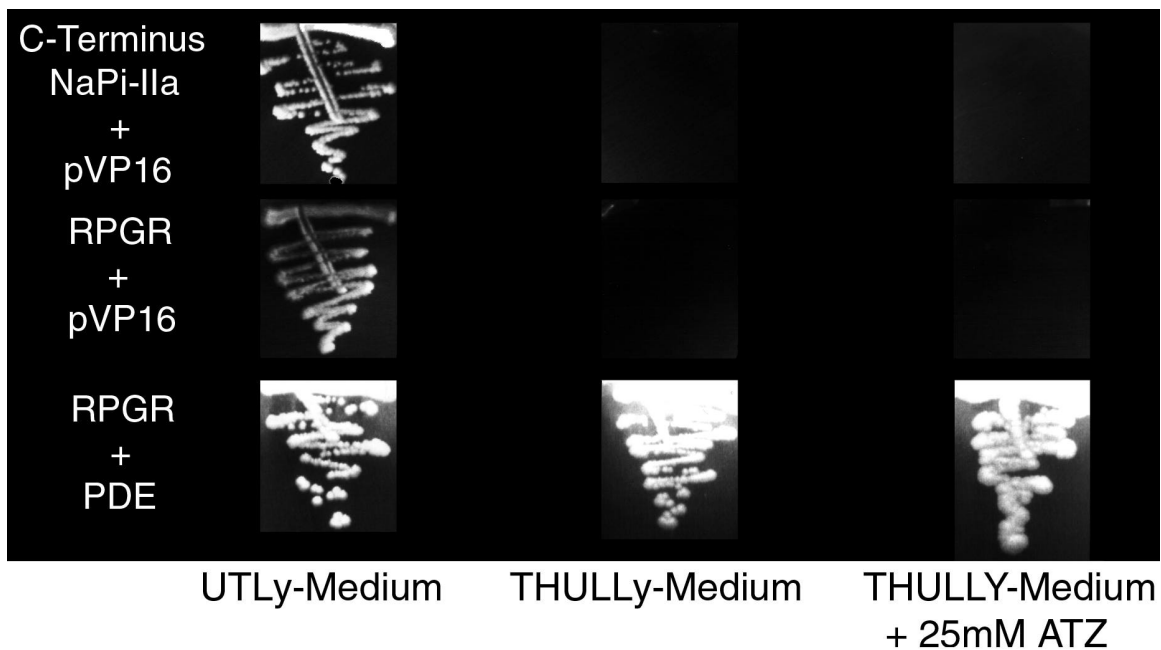


Abb. 6: Wachstum verschiedener kotransformierter Hefestämme auf Selektionsmedium. Das Köderplasmid mit dem C-Terminus von NaPi-IIa der Maus (pCMLexA) induziert in Abwesenheit eines interagierenden Partners (leeres Beuteplasmid pVP16) kein Wachstum auf Selektionsmedium. Als negative Kontrolle dient RPGR ohne Interaktionspartner, als positive Kontrolle RPGR mit dem Interaktionspartner PDE- δ (Linari 1999).

In diesem Fall ist der Inhibitor nicht zwingend erforderlich, da kein Wachstum in Abwesenheit eines Interaktionspartners detektiert ist. Im Falle des Zebrafischkonstrukts pCZFLexA wachsen die Hefezellen auch ohne Interaktionspartner (nicht gezeigt).

4.1.3 Screening der Bibliothek und Bestimmung der Spezifität von interagierenden Klonen

Zur Identifizierung von Proteindomänen, welche mit dem C-Terminus des Na⁺/Phosphat Kotransporters interagieren, wurde der Hefestamm L40 mit dem Plasmid pCMLexA transformiert. Dieser transformierte Stamm wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit der Two-Hybrid Bibliothek mit einer Effizienz von je ca. 30*10⁶ Klonen kotransformiert. Im ersten Screen wurden die Transformanten direkt auf THULLY-Selektionsplatten mit 25 mM 3-ATZ zur Unterdrückung von schwach interagierenden Klonen ausplattiert. Nach 12 Tagen wurden fünf Klone detektiert, welche unter diesen Bedingungen ein positives Signal lieferten. Diese Klone wurden in den *E.coli* Bakterienstamm HB101 überführt, um genug hochqualitative DNA für Sequenzierungsreaktionen zu erhalten. Die Analyse der Sequenzen ergab, daß zwei dieser Klone eine PDZ-Domäne enthalten und zwei Klone vom Gegenstrang eines bekannten Proteins kodiert werden. Ein weiterer Klon ist ein Homolog des Proteins NG22. Die identifizierten PDZ Domänen gehören zu NHE-RF (Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor) und zu Afadin. Die Spezifität der Bindung der Proteinfragmente wurde mit Hilfe von Kreuztransformationen analysiert. Hier hat sich gezeigt, daß alle Klone bis auf die PDZ-Domäne von Afadin eine hohe Spezifität in der Bindung zum C-Terminus der Maus besitzen. Afadin hat sowohl mit dem Maus- als auch mit dem Zebrafisch-C-Terminus ein deutliches Signal gezeigt. Darüber hinaus konnte sogar ohne Köderprotein eine Aktivierung des Reportergens detektiert werden, was auf eine unspezifische Bindung hinweist.

Die Bedingungen des zweiten Screens wurden leicht abgeändert, um eine höhere Klonierungseffizienz zu erreichen. Die Transformanten wurden zunächst auf THULLY-Selektionsplatten ohne ATZ ausplattiert und nach der ersten Selektion wurden Replikas der positiven Klone auf THULLY-Platten mit verschiedenen Konzentrationen von ATZ ausplattiert. Ohne 3-ATZ konnten mit dieser Methode ca. 300 Klone isoliert werden. Von diesen Klonen zeigten jedoch nur 14 ein starkes Wachstum auf THULLY-Platten mit 25 mM ATZ. Diese Klone wurden analog zum ersten Screen *in E. coli* überführt und sequenziert. Die Mehrzahl dieser Klone konnte aufgrund der Herkunft aus nichttranslatierter oder gegensträngiger DNA als falsch positiv identifiziert werden. Solche Klone kodieren teilweise für stark hydrophobe nichtnatürliche Proteine oder sehr kurze Peptidfragmente, welche für eine spezifische Interaktion in einer natürlichen Umgebung nicht geeignet sind. Einer der Klone konnte erneut als NHE-RF identifiziert werden. Somit konnte die im ersten Screen beobachtete Bindung dieser PDZ-Domäne an den C-Terminus des Na⁺/Phosphat-Kotransporters bestätigt werden. Ein weiterer Klon, welcher auf den Selektionsplatten die höchste Aktivierung aller Klone zeigte, besitzt ebenfalls eine PDZ-Domäne. Zum Zeitpunkt des Screens waren zu diesem Klon, welcher C160 genannt wurde, noch keine

homologen Proteine bekannt. Abb. 7 zeigt, daß diese Domäne vorzugsweise mit dem C-Terminus der Maus interagiert und nur eine geringere Aktivierung mit dem C-Terminus des Zebrafischs bewirkt. Mit einem leeren Köderplasmid oder RPGR ist keine Aktivierung detektierbar.

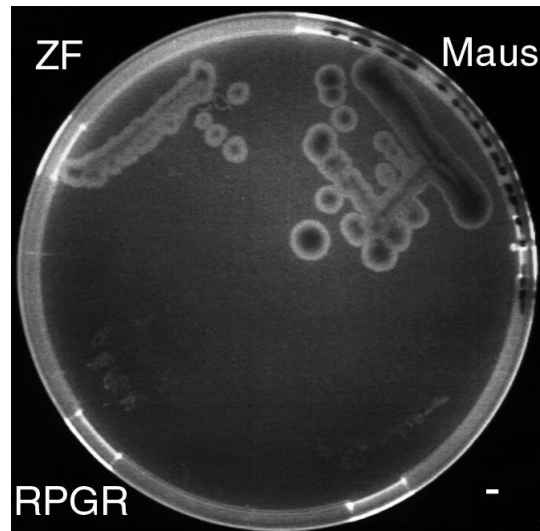


Abb. 7: Interaktion vom C-Terminus des Maus- bzw. Zebrafischtransporters mit C160. In den Kontrollen mit RPGR oder leerem Plasmid (-) ist kein Wachstum zu erkennen (Selektionsmedium THULLy + 25mM ATZ).

Die Ergebnisse des Screens sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die Sequenzen von ausgewählten Klonen sind im Anhang aufgeführt.

	NaPi-II C-Terminus		Leeres	RPGR	Bemerkungen
	Maus	Zebrafisch	Plasmid		
	ATRL	ATSL	DFYY	CTIL	
C160[PDZ]	++	+	-	-	wurde in dieser Arbeit kloniert und charakterisiert
NHERF[PDZ1]	+	-	-	-	wurde in Vorversuchen untersucht
Afadin[PDZ]	+	+	+	-	unspezifische Bindung mit leerem Plasmid
NG22H	+	-	-	-	homolog zu dem Protein NG22
Antisense zu SET	+	-	-	-	keine signifikanten Homologien auf Proteinebene

Tab. 2 Interaktion der identifizierten Proteindomänen mit dem NaPi-II C-Terminus und verschiedenen Kontrollproteinen im Two-Hybrid System. Die C-terminalen Sequenzen sind zum Vergleich angegeben.

Durch C160 wird in dem Reporterstamm ein besonders intensives Wachstum induziert. Deshalb wurde dieser Klon näher charakterisiert. Da die physiologische Bedeutung von NG22 und der beiden vom Gegenstrang kodierten Klone schlecht einschätzbar war, wurden diese Klone nicht weiter untersucht. NHERF wurde nur in Vorversuchen untersucht.

4.2 *In vitro* Interaktion von NaPi-IIa[C-Term] mit C160-[PDZ]

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen C160-[PDZ] und dem C-Terminus des Na⁺/Phosphat Kotransporters der Maus wurden zunächst beide Proteinfragmente mit unterschiedlichen Fusionsproteinen in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt, um mittels Blot-Overlay Technik eine direkte Interaktion der beiden Proteine *in vitro* nachzuweisen und die Affinität dieser Interaktion abzuschätzen.

4.2.1 Expression und Aufreinigung von GST-NaPi-IIa-[C-Term] und MBP-C160-[PDZ]

Vor dem präparativen Ansatz wurden zunächst Kombinationen verschiedener Fusionsproteine getestet. Die Expression des C-Terminus des Na⁺/Phosphat Kotransporters wurde in Fusion mit dem Maltose bindenden Protein, Polyhistidin (6xHis-Tag) oder der Glutathion-S-Transferase durchgeführt. Nur mit der Glutathion-S-Transferase konnte eine geringe, jedoch ausreichende Expression des C-Terminus erreicht werden. Die PDZ-Domäne von C160 konnte hingegen problemlos in Fusion mit dem Maltose bindenden Protein exprimiert werden.

4.2.2 Konstruktion der Expressionsvektoren pCMGEX und p160MBP

Analog zu dem Plasmid pCMLexA für den Two-Hybrid Screen wurden die letzten 72 C-terminalen Aminosäuren von NaPi-IIa der Maus zwischen die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I des bakteriellen Expressionsvektors pGEX-4T3 eingefügt. Hierdurch wurde der Vektor pCMGEX zur Produktion des Fusionsproteins GST-NaPi-IIa-[C-term] erhalten. Zur Konstruktion von p160MBP wurde der vollständige Bereich von C160 zwischen die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den bakteriellen Expressionsvektor pMal/Thrombin eingefügt. Dieser Bereich umfaßt außer der PDZ-Domäne noch einen kleinen Teil einer SH3-Domäne. Durch diese Klonierung wurde der Vektor p160MBP zur Expression des Fusionsproteins MBP-C160-[PDZ] erhalten.

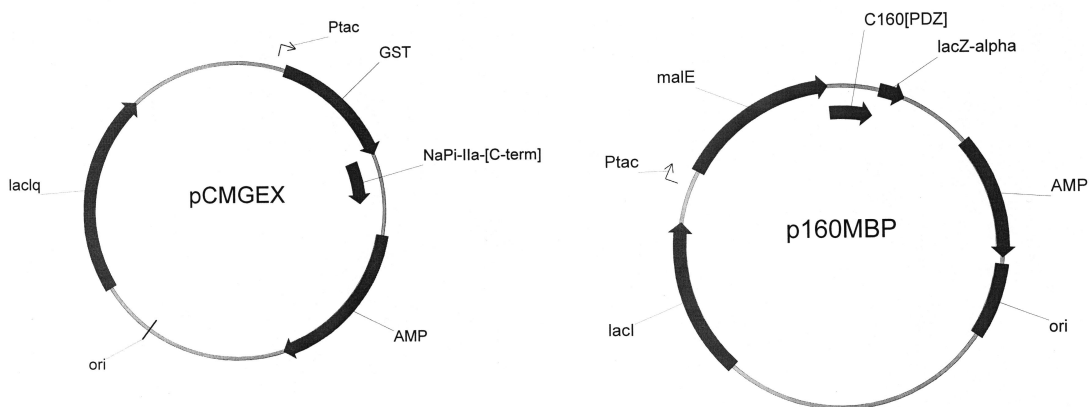


Abb. 8: Plasmidkarten der Vektoren pCMGEX und p160MBP.

4.2.3 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine

GST-NaPi-IIa-[C-Term] und MBP-C160-[PDZ] wurden in den *E.coli* Stamm BL21 gebracht, welcher für die Expression von Proteinen optimiert ist. Zur Analyse der Proteinexpression wurden Proben von verschiedenen Schritten der Expression und Aufreinigung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Wie in Abb. 9 gezeigt, ist vor der Induktion der Expression durch IPTG in beiden Ansätzen kein Fusionsprotein detektierbar. 4h nach der Induktion der Expression von MBP-C160-[PDZ] sind sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion deutliche Banden im Gel zu erkennen. Die detektierten Banden im Gel zeigen ein etwas höheres Molekulargewicht als das berechnete Molekulargewicht von 61kD.

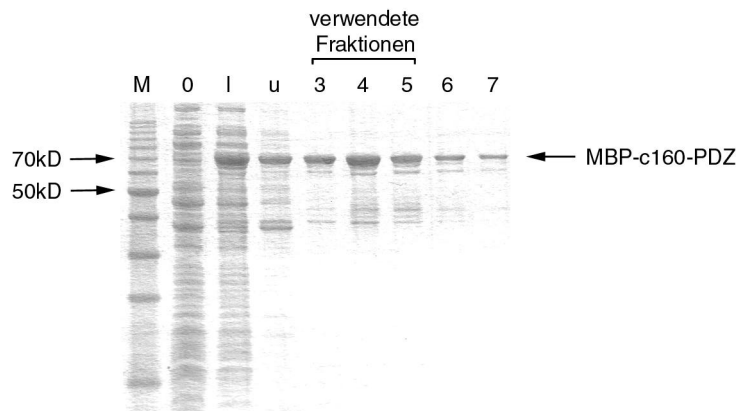


Abb. 9: Expression von MBP-C160[PDZ] in *E. coli*. M: Proteinmarker (10kD Ladder), 0: uninduzierte Zellen, l und u: induzierte Zellen – lösliche bzw. unlösliche Fraktion, 3-7 Elutionsfraktionen (je 5µl)

Für die Expression von GST-NaPi-IIa-[C-term]) ist in der löslichen und unlöslichen Fraktion vor allem der Fusionspartner GST mit einem Molekulargewicht von 29kD detektierbar. Das vollständige Protein mit einem Molekulargewicht von 38kD ist nur sehr schwer im Hintergrund der anderen Proteine zu erkennen. (Abb. 10)

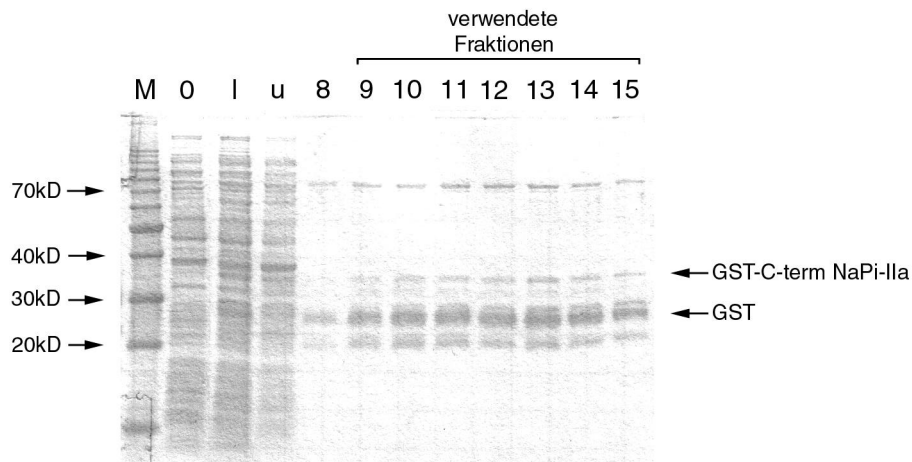


Abb. 10: Expression von GST-C-term in *E. coli* M: Proteinmarker (10kD Ladder), 0: uninduzierte Zellen, l und u: induzierte Zellen – lösliche bzw. unlösliche Fraktion, 8-15 Elutionsfraktionen (je 5µl)

Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie konnte in beiden Experimenten ein Großteil der *E.coli* eigenen Proteine entfernt werden. MBP-C160-[PDZ] ist in den Elutionsfraktionen nur noch mit geringen Mengen von fremdem oder unvollständigem Protein verunreinigt. GST-NaPi-IIa-[C-Term] ist durch die Affinitätschromatographie nur angereichert worden. Das Zielprotein ist zu etwa 5% in der Gesamtproteinmenge enthalten. Die Hauptverunreinigung ist der Fusionspartner GST, welcher in der Expression bereits in großen Mengen gebildet wurde und durch die Affinitätschromatographie zusammen mit der Fusion aufgereinigt wurde. In den nachfolgenden Experimenten stört diese Verunreinigung jedoch nicht.

4.2.4 Blot Overlay

Durch die Blot-Overlay Technik konnte die Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen *in vitro* bestätigt werden. GST-NaPi-IIa-[C-Term] wurde auf einer PVDF-Membran zusammen mit dem unvollständig gebildeten Fusionsprotein immobilisiert und mit einer Konzentrationsreihe des Bindungspartners MBP-C160[PDZ] inkubiert. Die Detektion des gebundenen Fusionsproteins zeigt deutlich, daß nur das vollständige GST-NaPi-IIa-[C-Term] mit diesem interagieren kann (Abb. 11).

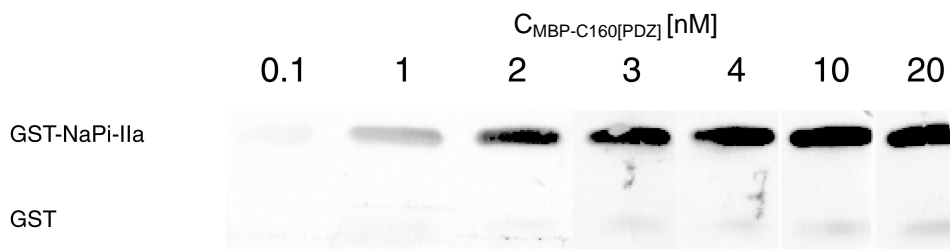


Abb.11: Blot-Overlay der Fusionsproteine MBP-C160[PDZ] und GST-NaPi-IIa (10%-PAGE nach Schägger - Westernblot auf PVDF-Membran – Detektion mit alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT). Es wurden jeweils ca. 2.2 ng GST-NaPi-IIa und ca. 42 ng GST geblottet. Die Lösung wurde mit 2ml einer BSA-haltigen Lösung von MBP-C160[PDZ] inkubiert.

Auf dem Blot sind ca. 19-mal mehr GST gegenüber GST-NaPi-IIa[C-Term] vorhanden. Nur bei den höchsten Konzentrationen von MBP-C160-[PDZ] ist eine geringe, unspezifische Bindung auf der Höhe von GST detektierbar. Im Gegensatz hierzu kann schon bei den geringsten Konzentrationen von MBP-C160-[PDZ] eine deutliche Bande auf der Höhe von GST-NaPi-IIa-[C-Term] identifiziert werden. MBP-C160 ist bei einer Konzentration von 1nM in einem zwanzigfachen molaren uberschuf im Überstand des Blots vorhanden. Die Änderung der Konzentration durch die Bindung des Substrats ist somit für diese und alle höheren Konzentrationen vernachlässigbar. Ein halbmaximales Signal ist bei einer Konzentration von 2nM MBP-C160-[PDZ] zu sehen. Die Affinität der Bindung der beiden Fusionsproteine kann somit auf 2nM abgeschätzt werden.

4.3 Klonierung der vollständigen C160 cDNA

Für weitere Experimente, welche eine physiologische Charakterisierung von C160 ermöglichen, wurde die komplette cDNA aus der Mäuseniere isoliert. In einem ersten Schritt wurde eine Mauseniern cDNA Bibliothek durch PCR untersucht. Hierdurch konnte nur ein partieller Klon erhalten werden. Der fehlende 5'-Bereich wurde mit Hilfe verschiedener RACE-Varianten amplifiziert und sequenziert. Die einzelnen Schritte der Klonierung sind in Abb.12 skizziert.

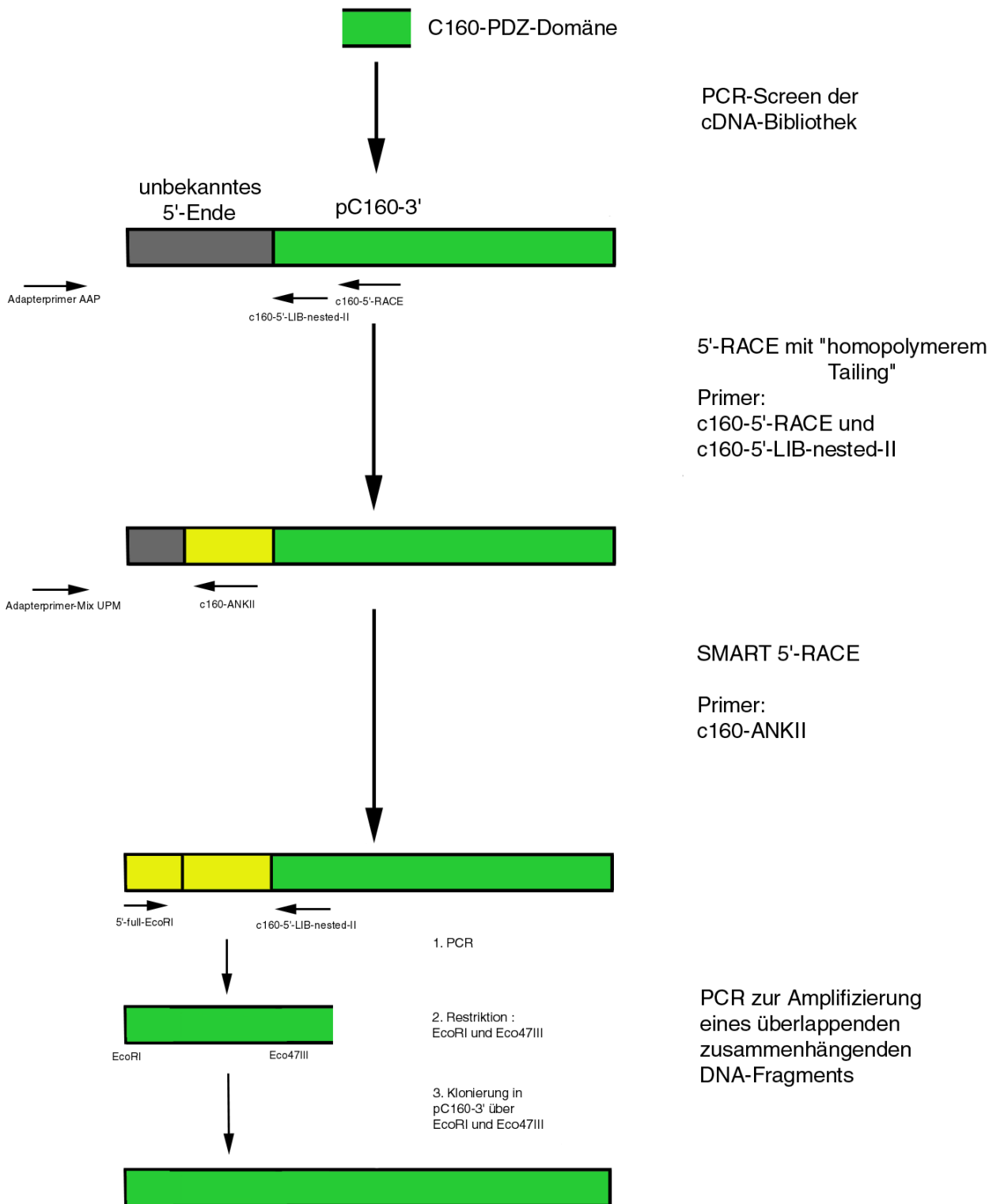


Abb.12: Klonierung von C160

4.3.1 PCR-Screening der cDNA Bibliothek

Mit Hilfe der PCR wurde C160 in einer adulten Mäusenieren cDNA Bibliothek gesucht. Hierfür wurden die Primer MTC160-nor und MTC160-rev verwendet. Durch die Analyse von $2 \cdot 10^6$ Klonen auf 10 Agarplatten zu jeweils 200.000 Klonen wurden zwei Pools identifiziert, welche den Zielklon enthalten. Durch die Aufteilung eines Pools in 2×13 Untermengen, welche jeweils genau definierten Abschnitten auf der Agarplatte entsprachen, wurde der Klon in einem kleinen Bereich eingegrenzt, welcher der Schnittmenge von zwei Untermengen entsprach. Die genaue Lokalisation des Klons wurde durch einen weiteren PCR-Screen identifiziert. Aus diesem Bereich wurden die Klone vereinzelt. Aus einem von 56 Einzelklonen konnte das Ziel-Plasmid isoliert werden (pC160-3'), welches nach einer Restriktionsanalyse einen Klon von 3.8 kb enthält. Durch Sequenzanalysen des 5'-Bereichs dieses Klons konnte kein Translationsstart identifiziert werden. Vor einer detaillierten Analyse der Sequenz wurde aus diesem Grund die fehlenden Sequenzinformation durch 5'-RACE amplifiziert.

4.3.2 5'-RACE durch homopolymeres Tailing

Zur Analyse des 5'-Bereichs des isolierten Klons wurde zunächst der C160-spezifische Primer c160-5'-RACE für die reverse Transkription eingesetzt. Die gebildete cDNA wurde mit einem homopolymeren Cytosinschwanz versehen. Durch eine Amplifikation der cDNA durch den Adapterprimer (AAP) und den genspezifischen Primer c160-5'-LIB-nested-II wurden zwei Hauptprodukte mit einer Länge von ca. 350bp und ca. 700bp gebildet (Abb 13 A). Als Kontrolle diente ein Versuch ohne reverse Transkriptase. Da hier keine Banden sichtbar waren, wurde eine Amplifizierung genomischer DNA ausgeschlossen. Die Reamplifikation mit beiden Primern lieferte ein zur ursprünglichen PCR analoges Produktbild. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Banden durch unspezifische Amplifikation mit einem einzelnen Primer gebildet werden. In diesen Reaktionen ist kein Produkt zu erkennen (Abb 13 B). Außerdem wurde die Spezifität der gebildeten Produkte durch eine verschachtelte Amplifikation mit dem Primer c160-5'-RACE-PstI und dem Adapterprimer AUAP überprüft. Das gebildete Bandenmuster ist auch hier analog zur Reamplifikation (Abb. 13-C).

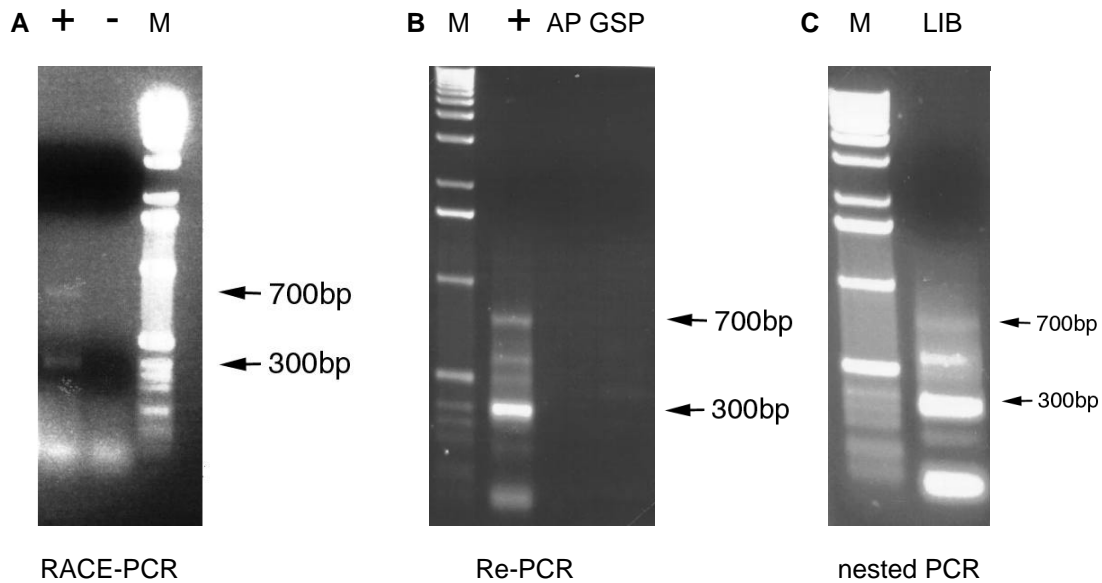


Abb.13: 5'RACE mit homopolymerem Tailing. A: erste RACE-PCR mit (+) bzw. ohne (-) reverse Transkriptase (ausgehend von 4ng mRNA). Zwei Banden sind in der Reaktion (+) detektierbar (ca. 700bp und 300bp). B: Die Re-PCR zeigt ein qualitativ vergleichbares Ergebnis (LIB) (ca.700bp und 300bp sowie weitere schwache Banden). Mit dem Adapterprimer (AP) oder dem genspezifischen Primer (GSP) allein ist kein Amplikon detektierbar. C: Auch in der nested PCR ist das ursprüngliche Bandenmuster zu erkennen (LIB). Als Standard wurde eine 1kb Leiter aufgetragen (M)

Durch den verschachtelten Primer c160-5'-RACE-PstI wurde den Fragmenten eine *Pst*I-Schnittstelle zugefügt, welche zusammen mit der Schnittstelle *Sa*II auf dem Adapterprimer eine Klonierung der Produkte ermöglichte. Einzelne DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in den Klonierungsvektor pBluescript SK(+) kloniert. Durch eine anschließende PCR mit Bakterienkolonien wurde die Größe der klonierten Inserts bestimmt. Klone von verschiedenen Längen wurden sequenziert. Die Sequenz des Klons 4/700 (ca. 700bp) lieferte 517 zusätzliche Basenpaare im 5'-Bereich von C160. Die Sequenz überlappt mit der bereits bekannten Sequenz im 3'-Bereich. Hierdurch konnte eindeutig gezeigt werden, daß die amplifizierte Bande von der C160 mRNA stammt. Ein Translationsstart fehlte jedoch auch in dieser Sequenz. Vermutlich scheiterte die Methode an dem hohen GC-Gehalt im 5'-Bereich des Klons. Wenn der Adapterprimer interne cytosinreiche Segmente erkennt, werden hierdurch verkürzte Amplikons gebildet. Außerdem können stabile Sekundärstrukturen in der mRNA oder der einzelsträngigen cDNA die Amplifizierung behindern. Aus diesen Gründen wurde eine alternative Variante der 5'-RACE verwendet. Mit diesem optimierten Verfahren konnte mehr Sequenzinformation erhalten werden.

4.3.3 SMART 5'-RACE

Das Prinzip dieser Variante entspricht dem vorherigen Experiment. Durch die Verwendung eines speziellen Oligonukleotidgemischs in der reversen Transkription, wird hier ein Adapter an das 5'-Ende der Sequenz angehängt. Im Gegensatz zur vorherigen Methode ist dies nicht in internen Bereichen möglich. Mit Hilfe der bisherigen Sequenzinformationen wurde für dieses Experiment der C160 spezifische Primer c160-ANKII konzipiert. Die erste PCR mit XL-Polymerase, c160-ANKII und dem Universal Primer Mix (UPM) lieferte bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1.2 mM eine deutliche Bande nach 40 Amplifikationszyklen (Abb. 14).

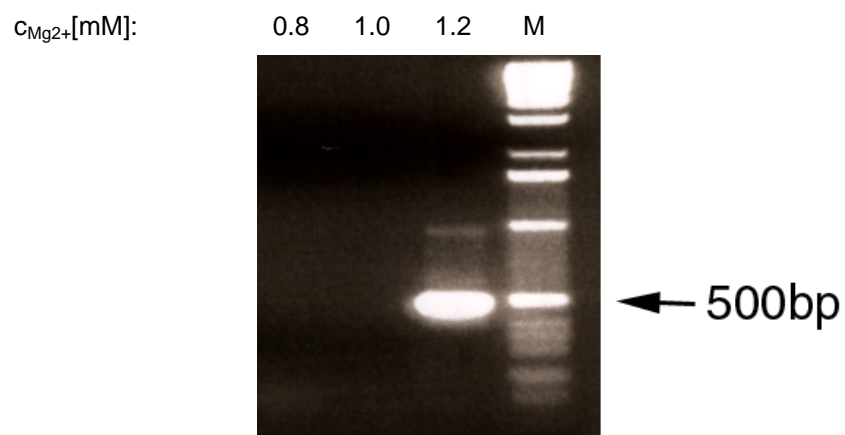


Abb. 14: Smart 5'-RACE – Amplifizierung mit XL-Polymerase (ausgehend von 2ng mRNA). Bei einer Konzentration von 1.2mM Mg^{2+} ist eine deutliche Bande bei 500bp zu erkennen. Als Standard wurde eine 1kb Leiter aufgetragen (M)

Diese Bande wurde aufgereinigt und direkt sequenziert. In dieser Sequenz konnte ein sinnvoller Translationsstart identifiziert werden. Ein weiteres ATG-Kodon ist aufgrund der Position im extremen 5'-Ende dieser Sequenz nicht als Translationsstart geeignet. Ein alternativer zusätzlicher Start in möglicherweise unsequenzierten Bereichen des 5'-Endes konnte aufgrund eines distalen Stop-Codons für diese Sequenz ausgeschlossen werden (Abb. 15).

4.3.5 Sequenzanalysen von C160

Die C160 cDNA wurde mit dem Programm TRANSLATE von dem ExpASY-Web Server in Protein übersetzt. Der offene Leserahmen von 709 Aminosäuren wird im 5'-Bereich von 73 bp und im 3'-Bereich von 2501 bp untranslatierter Sequenzinformation flankiert. Die Domänenstruktur der Sequenz wurde mit Hilfe des Programms SMART von dem EMBL Web-Server aus Heidelberg analysiert. Im 5'-Bereich wurden 5 Ankyrin-repeats identifiziert. Eine SH3-Domäne befindet sich zwischen den Ankyrin-repeats und der bereits identifizierten PDZ-Domäne. Um homologe Proteine zu identifizieren, wurde die Sequenz mit der Swiss-Prot Proteindatenbank über das Programm BLAST von dem NCBI-Web Server (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda) analysiert. Homologe Proteine und Domänen wurden zusammen mit der C160 Sequenz mit dem Programm CLUSTAL 1.2 verglichen. Die Sequenz zeigt eine sehr hohe Homologie zu der Shank-Familie. Aus Vergleichen auf cDNA-Ebene wird klar ersichtlich, daß es sich bei diesen Proteinen um Abkömmlinge einer großen Genfamilie handelt. Eine eingehende Untersuchung der Protein- und DNA-Sequenz zeigte, daß C160 eine alternative Spleißform von Shank3/ProSAP2 ist (Abb. 16).

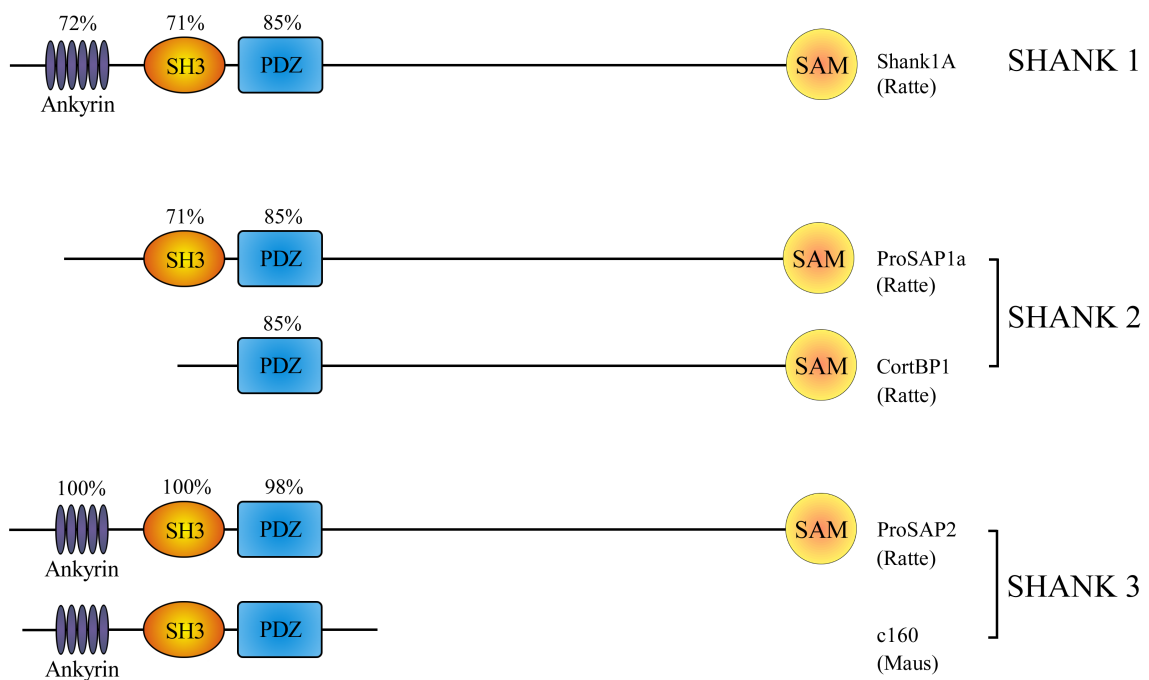


Abb. 16: Vergleich der Domänenstruktur verschiedener Isoformen der Proteinfamilie Shank. Die Identität der Proteinsequenz von Domänen zu C160 ist in Prozent angegeben. C160 gehört aufgrund der hohen Homologie zu ProSAP2 der Untergruppe SHANK3.

Zum Zeitpunkt des Two-Hybrid Screens war noch keines dieser Proteine identifiziert worden. Inzwischen wurden jedoch drei Gene identifiziert, welche zu dieser Familie gezählt werden. Auf verschiedenen Cosmidklonen des menschlichen Genoms wurden hohe Homologien zu C160 gefunden, welche für die Mitglieder dieser Familie kodieren. Eine aus der genomischen Sequenz konstruierte, unvollständige menschliche Isoform von C160 (hC160) und ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenz mit der Maus ist im Anhang dargestellt. Die zugehörigen Klone sind im Chromosom 22 (Abschnitt 22q13) lokalisiert.

4.4 Gewebeverteilung von C160

Zur weiteren Charakterisierung des Proteins C160 wurde untersucht, ob die Verteilung der korrespondierenden mRNA mit der von NaPi-IIa übereinstimmt.

4.4.1 Multiple Tissue cDNA-Panel (MTC-Panel)

Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen cDNA-Panels wurde mittels PCR die relative Häufigkeit von C160 in verschiedenen Geweben untersucht. Als Primer wurden MTC-160-nor und MTC-160-rev verwendet, welche die PDZ-Domäne von C160 flankieren. Die Analyse der gebildeten PCR-Produkte zeigt, daß die Menge dieser mRNA in allen Geweben etwa gleich hoch ist (Abb. 17). Die geringen Unterschiede sind nicht relevant, da die Normierung des Panels nicht perfekt ist. Eine vergleichende Untersuchung mit den Primern MTC-NaPi7-nor und MTC-NaPi7-rev, durch welche der C-terminale Abschnitt des Na⁺/Phosphat-Kotransporters amplifiziert wurde, zeigt im Gegensatz zu C160 deutliche Unterschiede in der Häufigkeit dieser mRNA in den verschiedenen Geweben.

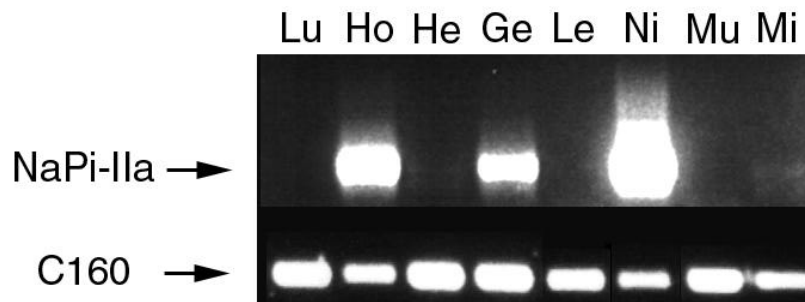


Abb. 17: normierter MTC-Panel (ca. 0.5ng pro Gewebe). NaPi-IIa (38 PCR-Zyklen) wird hauptsächlich in Niere (Ni), Hoden (Ho) und Gehirn (Ge) exprimiert. In der Milz (Mi) ist ein sehr geringes Signal detektierbar. Lunge (Lu), Herz (He), Leber (Le) und Muskel (Mu) sind negativ. C160 (34 PCR-Zyklen) ist in allen Geweben exprimiert.

Die relative Häufigkeit der C160 mRNA in den jeweiligen Geweben ist sehr gering. Mit den Standardprimern des Panels, welche einen Abschnitt der sehr häufigen G3PDH mRNA amplifizieren, wurde ein Vergleich durchgeführt (Abb 18).

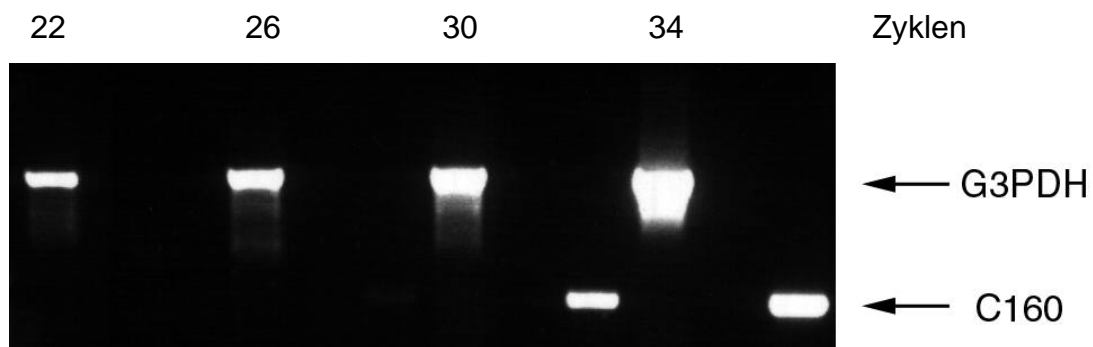


Abb. 18: Vergleich der Häufigkeit von C160 mit dem "high copy" Gen G3PDH (0.5ng cDNA).

Für die Amplifikation von C160 wurden 8 zusätzliche Zyklen benötigt, um eine vergleichbare Produktmenge wie in der Amplifikation von G3PDH zu erhalten.

4.4.2 Northern-Blot

Durch die PCR kann nur die Existenz einer mRNA in einem bestimmten Gewebe nachgewiesen werden. Die Länge einer bestimmten mRNA kann hingegen durch einen Northern-Blot analysiert werden. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der selektiven Bindung einer radioaktiven, komplementären RNA-Sonde an mRNA Moleküle, welche nach einer elektrophoretischen Auftrennung auf einer Membran immobilisiert wurden. Die Nachweisgrenze dieser Methode ist deutlich niedriger als bei der RT-PCR. Dennoch reicht die Sensitivität aus, um aus wenigen µg

totaler RNA ein Transkript mittlerer Häufigkeit zu identifizieren. Die C160 mRNA besitzt nach den Ergebnissen aus der RT-PCR eine geringe Häufigkeit. Aus diesem Grund wurde für den Northern-Blot statt totaler RNA aufgereinigte mRNA der Mäuseniere verwendet. Als Sonde wurde der vollständige 3'-Bereich von c160 (aus dem Vektor pC160-3' mit SP6-Polymerase) verwendet. Abb. 19 zeigt ein schwaches Signal auf der Höhe von 4.8kb. Diese Größe entspricht dem vollständigen Klon von C160.

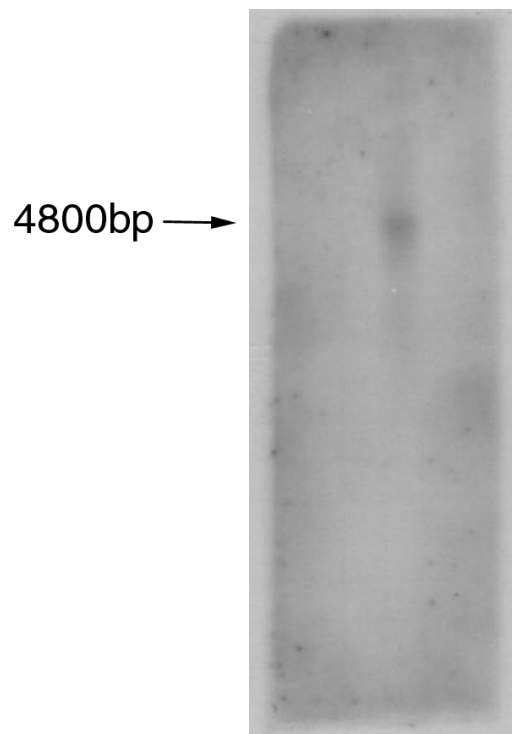


Abb. 19: Northern Blot zur Identifizierung der C160 mRNA in der Niere – Auftrennung von 2µg mRNA über ein 1%-denaturierendes Agarosegel - Blot auf Nylon Membran - Detektion mit einer radioaktiv markierten Sonde ($1.6 \cdot 10^6$ cpm/ml Exposition des Films über drei Tage)

4.5 Heterologe Expression in Opossum Kidney-Zellen

Opossum Kidney-Zellen (OK-Zellen) sind ein geeignetes Expressionssystem zur Untersuchung des Na^+ /Phosphat Kotransporters NaPi-IIa. Aus diesem Grund wurde dieses Zellsystem zur Untersuchung der Lokalisation des potentiellen Interaktionspartners C160 verwendet. Zunächst wurde versucht, das endogene C160 Homolog aus OK-Zellen zu identifizieren. Hierzu wurde RT-PCR verwendet, um das korrespondierende Transkript nachzuweisen. Zum Nachweis des Proteins wurde ein Antikörper gegen eine Peptidsequenz zwischen der SH3-Domäne und der

PDZ-Domäne von C160 hergestellt. Hiermit wurden Western-Blots und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

4.5.1 Nachweis eines homologen Transkripts

Zunächst wurden Suchprimer konzipiert, mit dessen Hilfe die Sequenz der PDZ-Domäne von C160 in OK-Zellen amplifiziert werden konnte. Für die Primerkonzeption wurde ein Sequenzvergleich mit der C160 Isoform des Menschen durchgeführt, um besonders stark konservierte Bereiche zu identifizieren. Der 3'-Bereich des Primers muß besonders gut mit der DNA hybridisieren, um eine Initiation der Polymerisation zu erreichen. Daher wurden Primersequenzen bevorzugt, welche in diesem Bereich für strukturgebende Aminosäuren kodieren (z.B. Prolin oder Glycin). Falls eine stille Mutation in der Nähe des 3'-Endes des Primers möglich ist, wurde ein Nukleotidgemisch für die Synthese des Oligonukleotids verwendet ("wobbles").

```

T V K G R T G W F P A D C V E E V Q M
human_C160   ACCGTGAAAGGCCGACCGGCTGGTTCCCGGCCGACTGCGTGAGGAAGTGCAGATGAGG 60
mouse_C160   ACCGTGAAAGGCCGAACAGGCTGGTTCCAGCTGACTGTGTGGAAGAAGTGCAGATGCCA 60
*****  *****  **  *****  **  *****  *****  *****  *
nor-160s     5'-GTGAAGGGCCGAACAGGCTGGTTCCC-3'
alternative Base      C G T

nor-160s-nested          5'-GCTGACTGCGTGGAGGAAGTGCAGATG-3'
alternative Base              A A

human_C160   CAGCATGACACACGGCCTGAAACCGGGGAGGACCGGACGAAGCGGCTCTTTCGGCACTAC 120
mouse_C160   CAGTATGACACCCGGCATGAAACCAGAGAGGACCGGACGAAGCGTCTCTTCCGCCACTAC 120
***  *****  *****  *  *****  *****  *****  **  *****

human_C160   ACAGTGGG...                               ...GGTGGCTCTGATTCGC 420
mouse_C160   ACTGTGGG...                               ...GGTGGTCTCATCCGT 420
** **                               ***** ** **

Q G G N R L V M K V
human_C160   CAGGGTGGCAACCGCCTCGTCATGAAGGTGTG
mouse_C160   CAGGGTGGCAACCGCCTGGTCATGAAGGTGTG
*****  *****
rev-160s     GTCCCACCGTTGGCGGACCAGTACTTCCAA
alternative Base      T G
(komplementär)

```

Abb. 20: Konzeption der Suchprimer.

Die RT-PCR wurde unter Standardbedingungen mit *Taq*-Polymerase und AMV-Reverser Transkriptase durchgeführt. Zunächst wurden die Primer nor-160s und rev-160s verwendet. Ausgehend von 1µg totaler RNA aus OK-Zellen wurde zunächst keine analysierbare Produktmenge erhalten. Durch eine weitere Amplifikation mit dem verschachtelten Primer nor-160s-nested konnte eine ausreichende Produktmenge gebildet werden (Abb. 21).

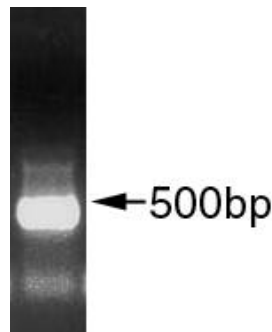


Abb. 21: Amplifizierung eines C160 Homologs aus OK-Zellen.

Das Produkt wurde sequenziert und die erhaltene Sequenz wurde mit dem Programm Translate übersetzt und mit Clustal 1.2 mit der Sequenz vom Menschen und der Maus verglichen. Aus Abb. 22 ist klar ersichtlich, daß die amplifizierte Sequenz für ein homologes Protein zu C160 aus Opossum kodiert.

```

c160_human      -----ACCGTGAAAAGGCCGCACGGGCTGGTTCCCGGCCGACTGCGTGGAGGAAGTGCA  53
c160_mouse      GGAGGGAACCGTGAAGGGCCGAACAGGCTGGTTCCAGCTGACTGTGTGGAAGAAGTGCA 1140
c160_ok         -----

c160_human      GATGAGGCAGCATGACACACGGCCTGAAACGCGGGAGGACCGGACGAAGCGGCTCTTTCG  113
c160_mouse      GATGCGACAGTATGACACCCGGCATGAAACCAGAGAGGACCGGACGAAGCGTCTCTTCCG  1200
c160_ok         -----AGACATGAAACACGTGAGGACCGAACCAAGCGCCTTTTCCG  41
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

c160_human      GCACTACACAGTGGGCTCCTACGACAGCCTCACCTCACACAGCGATTATGTCATTGATGA  173
c160_mouse      CCACTACACTGTGGGTTCCCTATGACAGCCTCACTTCACACAGCGATTATGTCATCGATGA 1260
c160_ok         ACACTATACTGTGGGCTCTTACGACAGCCTCACCTCACACAGTGACTACGTCATTGAGGA  101
                ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

c160_human      CAAAGTGGCTGTCTCGCAGAAACGGGACCACGAGGGCTTTGGTTTTGTGCTCCGGGGAGC  233
c160_mouse      TAAGGTGGCTATCCTGCAGAAAAGGGACCATGAGGGGTTGGCTTTGTCTCCGGGGAGC  1320
c160_ok         CAAGGTGGCTGTCTCGCAGAAACGGGAGCAGGAAGTTTTGGCTTCGTCCTTCGGGGAGC  161
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

c160_human      CAAAGCAGAGACCCCATCGAGGAGTTCACGCCACGCCAGCCTTCCCGGCGCTGCAGTA  293
c160_mouse      CAAAGCAGAGACCCCATGAGGAGTTTACACCCACACCTGCCTTCCTGCACTCCAATA  1380
c160_ok         CAAAGCAGAGACCCCATGAGAATTACACCAACCCAGCCTTCCTGCTCTCCAGTA  221
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

c160_human      TCTCGAGTCGGTGGACGTGGAGGGTGTGGCCTGGAGGGCCGGGCTGCGCACGGGAGACTT  353
c160_mouse      CCTTGAGTCTGTAGATGTGGAAGGTGTGGCCTGGAGGGCTGGACTTCGAACTGGGGACTT  1440
c160_ok         CTTGGAATCTGTGATTATGAGGGTGTGGCCTGGAGGGCAGGACTGCGAACTGGAGACTT  281
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

c160_human      CCTCATCGAGGTGAACGGGGTGAACGTGGTGAAGGTCGGACACAAGCAGGTGGTGGCTCT 413
c160_mouse      CCTCATTGAGGTGAACGGAGTGAATGTCGTGAAGGTTGGACACAAGCAAGTGGTGGGTCT 1500
c160_ok         CCTGATTGAGGTGAATGGAGTGAATGTGGTGAAGGTGGGGCATAAGCAGGTCGTGGCCCT 341
                *** ** ***** ** ***** ** ***** ** ** ***** ** ***** **

c160_human      GATTCGCCAGGTGGCAACCGCCTCGTCATGAAGGTTGTGTCTGTGACAAGGAAGCCAGA 473
c160_mouse      CATCCGTCAGGTGGCAACCGCCTGGTCATGAAGGTTGTGTCTGTGACCAGGAAACCCGA 1560
c160_ok         AATCCGCCA----- 350
                ** ** **

```

Abb. 22: Sequenzvergleich der Sequenz aus OK-Zellen mit der menschlichen bzw. Mausequenz.

4.5.2 Nachweis eines homologen Proteins

Ob neben der mRNA für C160 auch das Protein exprimiert ist, kann durch einen Western-Blot untersucht werden. Hierfür wurde zunächst ein Peptid-Antikörper gegen C160 hergestellt. Hierzu muß eine Sequenz von C160 ausgewählt werden, welche einzigartig und für einen Antikörper gut zugänglich ist. Als geeignetes Epitop wurde ein Bereich zwischen der SH3- und der PDZ-Domäne gewählt (NH₂-RHETREDRTKRLFR-CONH₂ Abb. 23).

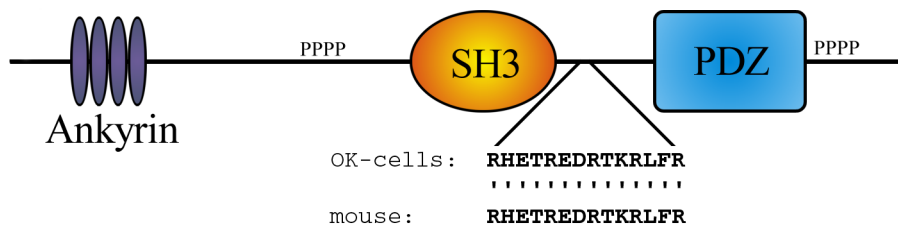


Abb. 23: Position des Antigens gegen c160

Dieses Peptid ist in den untersuchten Spezies sehr gut konserviert. Außerdem befinden sich in dieser Sequenz zahlreiche geladene Aminosäuren (R, E, K), welche eine hochaffine Bindung für einen Antikörper erwarten lassen. Ein C-terminales Cystein wurde zur Kopplung an das Trägerprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) angefügt. Zur Antikörperbildung wurden zwei Kaninchen (2426 und 2427) mit dem Antigen immunisiert.

4.5.2.1 Charakterisierung des Antikörpers

Vor der Western-Blot Analyse wurde zur Überprüfung der Spezifität des erhaltenen Antiserums die Dot-Blot Methode verwendet. Hierfür wurden die Antiseren und die Präimmunseren der beiden Kaninchen getestet. Auf die linke obere Ecke einer Nitrocellulosemembran wurden 50ng MBP-C160-[PDZ] aufgetragen. Als Kontrolle dienten 50ng von Maltose bindendem Protein (MBP). Diese Membranen wurden mit dem Präimmunserum und dem Antiserum gegen C160 (Antikörper 2426 und 2427) unter den Bedingungen eines Western-Blots inkubiert.

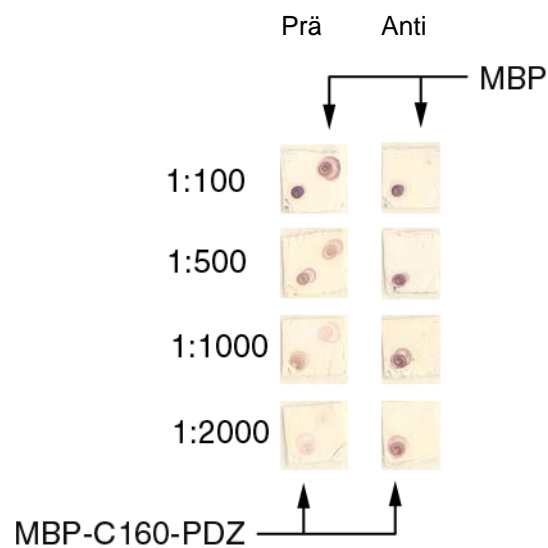


Abb. 24: Dot-Blot zur Bestimmung des Titers - Inkubation mit einem Antikörper gegen C160 (2426) bzw. dem Präimmunserum (1:100, 1:500, 1:1000 und 1:2000 verdünnt / Detektion mit anti-Kaninchen gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:2000) / colorimetrische Detektion). (jeweils 50ng Protein)

Das Serum 2426 erkennt das Epitop im Vergleich mit dem Präimmunserum auch bei höheren Verdünnungen. Die negative Kontrolle (MBP) ist für alle Konzentrationen des Antiserums negativ. Dieser Antikörper wurde deshalb in den folgenden Untersuchungen in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet.

4.5.2.2 Western-Blot

Für den Western-Blot wurden OK-Zellen nach einer modifizierten Methode von Lin et al. aufgearbeitet und mit dem Antikörper 2426 gegen C160 untersucht.

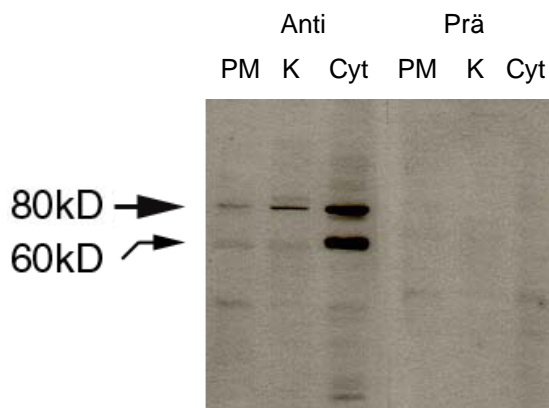


Abb. 25: Western-Blot von fraktionierten OK-Zellen - 10%iges Tris/Tricin Polyacrylamidgel PM: Plasmamembran (1 μ g) , K: Kern (3 μ g), Cyt: Cytosol (9 μ g) - Inkubation mit einem Antikörper gegen C160 (2426 1:2000 verdünnt / Detektion mit anti-Kaninchen gekoppelt an Meerrettich Peroxidase 1:10000 verdünnt – ECL-Kit 15min Exposition)

Der Western-Blot zeigt in der Kern-, Plasmamembran- und Cytosolfraktion eine deutliche Bande bei ca. 80kD. Das Präimmunserum ist negativ. C160 aus der Maus besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 77kD. Diese Größe stimmt sehr gut mit der größeren Bande im Western-Blot überein. Die hohe Intensität der Bande in der Cytosolfraktion entspricht nicht einer Anreicherung. Sie beruht nur auf der großen Menge an Protein die aufgetragen wurde. Alle Fraktionen zeigen relativ zur aufgetragenen Menge ungefähr die gleiche Intensität. Eine zweite Bande bei ca. 60kD wird vom Antikörper ebenfalls erkannt, ist jedoch in der cytosolischen Fraktion angereichert. Möglicherweise gehört diese Bande zu einer alternativ gespleißten kürzeren Isoform.

4.5.2.3 Immunhistochemie

Zur Lokalisation von C160 in OK-Zellen wurde versucht, das endogene Protein mit Hilfe des Antikörpers 2426 immunhistochemisch zu detektieren. Parallel wurde versucht, den endogenen Na⁺/Phosphattransporter mit einem spezifischen Antiserum zu detektieren. Die Signale waren jedoch zu schwach, um die Lokalisation der Proteine zu bestimmen. Um die Konzentration von C160 in den Zellen zu erhöhen, wurde C160 aus der Maus transfiziert.

Der Vektor pC160 ist von dem eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-Sport3 abgeleitet. Nach der Transfektion dieses Plasmids in Säugerzellen, wird C160 konstitutiv exprimiert. Zunächst wurden OK-Zellen nur mit dem Plasmid pC160 transformiert und immunhistochemisch untersucht. Die Färbung von C160 weist in diesen ersten Experimenten auf eine Lokalisation an der Plasmamembran hin. Um die Membranständigkeit von C160 zu überprüfen, wurden die Proben im konfokalen Mikroskop untersucht. Zur Darstellung einer möglichen Kolo-kalisation mit NaPi-IIa, wurde dieses Protein, gekoppelt mit einem N-terminalen FLAG-Epitop, kotransfiziert.

Für die Lokalisation wurde der primäre Antikörper 2426 gegen C160 (aus Kaninchen) und ein primärer monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop (aus Maus) verwendet. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte durch zwei sekundäre Antikörper, welche mit unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren. Nach der Antikörperbehandlung wurden die Zellen unter dem konfokalen Laserrastermikroskop (Nikon) analysiert. Mit der Hilfe eines konfokalen Mikroskops können beliebige zweidimensionale Schnittebenen durch ein dreidimensionales Präparat dargestellt werden. Die Darstellung in den Koordinaten x und y entspricht hierbei der Abbildung eines herkömmlichen Mikroskops. Es sind jedoch durch die Beschränkung auf einen engen Bereich in der z-Koordinate mehr Details in dieser Schnittebene zu erkennen. Deshalb ist es möglich, x-y Schnitte durch den luminalen bzw. basolateralen Bereich von polarisierten Zellen darzustellen. Die Auflösung in der z-Koordinate ist im allgemeinen schlechter als in der x-y Ebene. Dennoch ist es möglich, aus einer aufeinanderfolgenden Serie von x-y Darstellungen einen Schnitt entlang der z-Koordinate darzustellen. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen verschiedene Darstellungen der gleichen kotransfizierten Zelle.

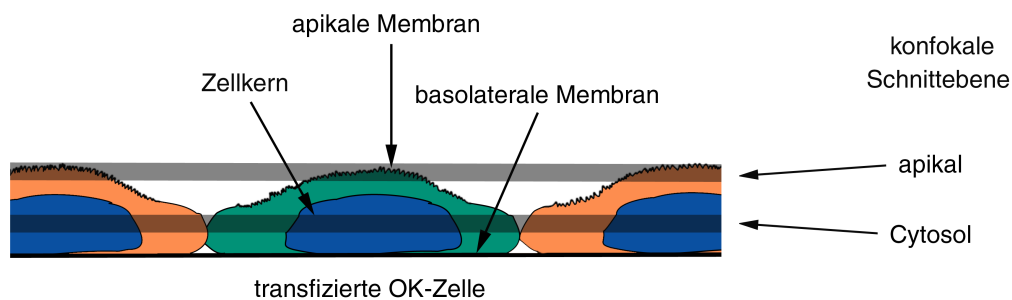
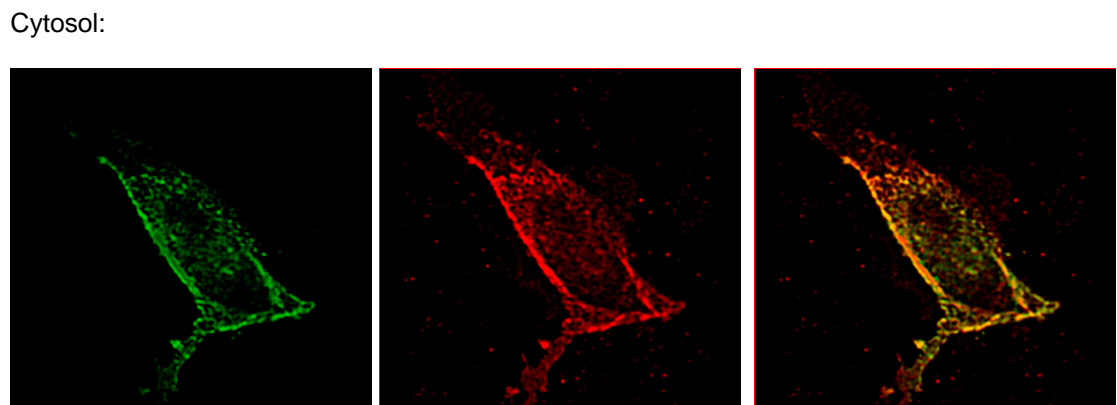
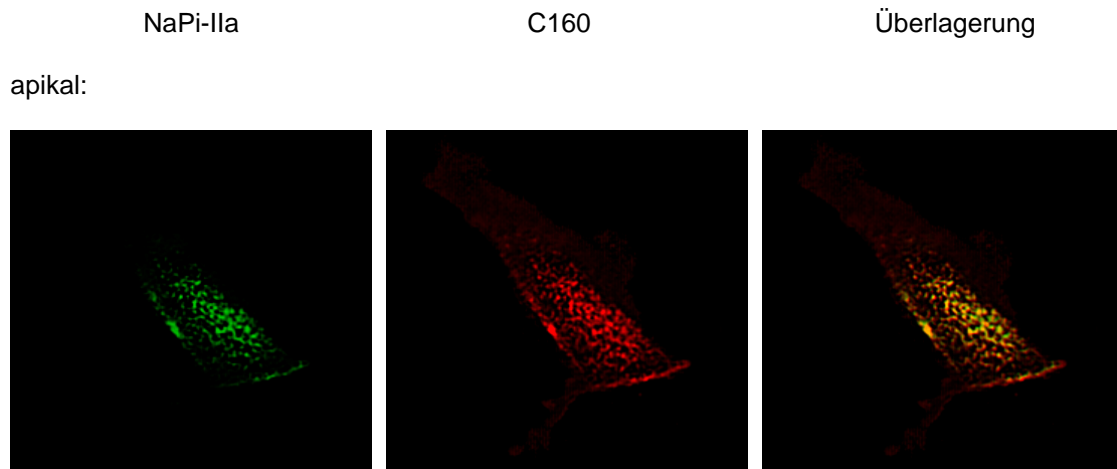


Abb. 26: Konfokale x-y Schnitte der mit C160 und N-Flag-NaPi kotransfizierten OK-Zellen - Inkubation mit einem Antikörper gegen C160 (2426 1:1000 verdünnt / Detektion mit anti-Kaninchen Cy3 1:100 verdünnt – 532nm) und einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Anti-FLAG 1:1000 verdünnt / Detektion mit anti-Maus Cy2 1:100 verdünnt – 488nm) (Vergr.:400x).

Man erkennt in dieser Aufnahme eine deutliche Anreicherung der Signale in der Bürstensaummembran. Werden die beiden Bilder kombiniert, scheinen die Bereiche, in denen C160 und NaPi-IIa kolokalisiert sind, gelb. Das heißt, es ist eine Kolokalisation von C160 mit NaPi zu beobachten. Zur genauen Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurden

Schnittaufnahmen entlang der z-Achse dargestellt (Abb. 27). In dieser Darstellung ist eine deutliche Anreicherung des Fluoreszenzsignals in apikalen Bereichen zu beobachten.

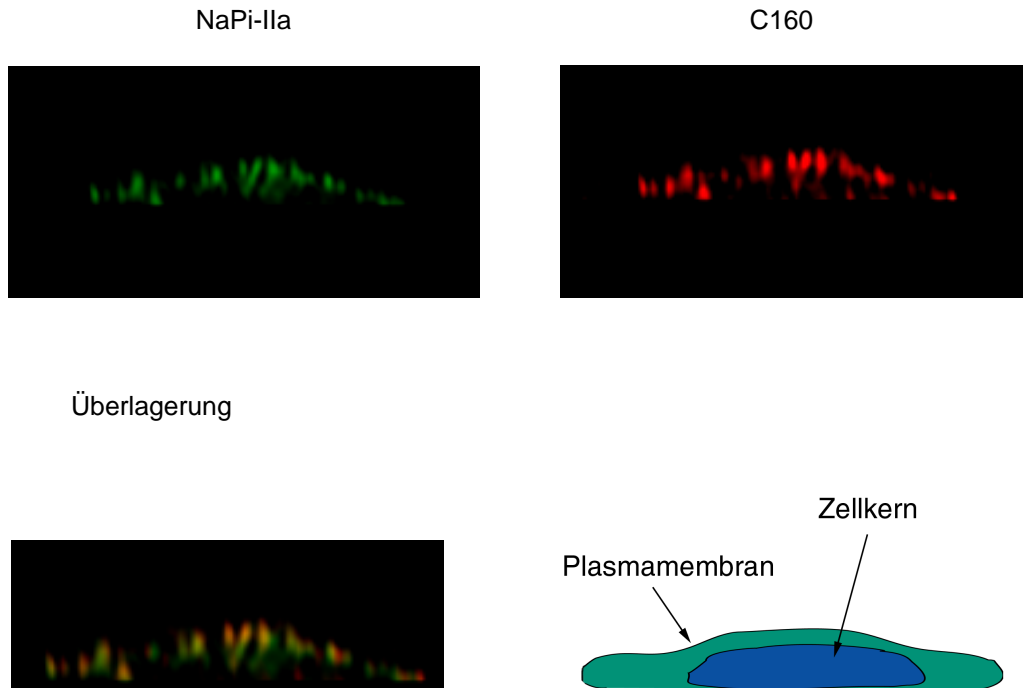


Abb. 27: z-Schnitte einer immunmarkierten OK-Zelle. (Vergr.:400x)

Beide Proteine befinden sich hiernach in dem selben subzellulären Kompartiment. Eine Interaktion der Proteine ist hiermit möglich. Es bleibt jedoch zu prüfen, ob die Proteine im selben Zelltyp der Niere exprimiert werden.

4.6 Lokalisierung von C160 in der Mäuseniere

Bei den Untersuchungen in OK-Zellen handelt es sich um Experimente unter unnatürlichen Bedingungen. In diesen Zellen wurde C160 und NaPi-IIa der Maus heterolog überexprimiert. Beide Proteine sind in der Bürstensaummembran angereichert. Ob diese Situation auch *in vivo* vorliegt, wurde durch Immunhistochemie an Gewebeschnitten untersucht. Ergänzend wurden Western-Blots angefertigt, um die Resultate durch eine unabhängige Methode zu bestätigen.

4.6.1 Western-Blot

Abb. 28 zeigt die ersten Untersuchungen an der Bürstensaummembranfraktion und Gesamthomogenat der Mäuseniere. Der Westernblot zeigt eine deutliche Bande bei ca. 70kD, welche jedoch nicht signifikant in der Bürstensaumfraktion angereichert ist.

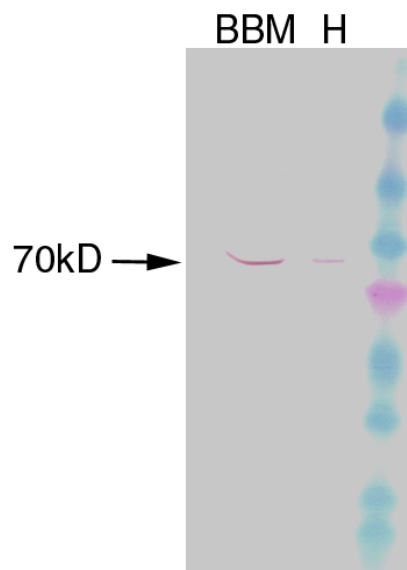


Abb. 28: Western-Blot von fraktionierten Mäusenieren - 10%iges Tris/Tricin Polyacrylamidgel BBM: Bürstensaummembranen (20 µg) , H: Homogenat (20 µg) - Inkubation mit einem Antikörper gegen C160 (2426 1:2000 verdünnt / Detektion mit anti-Kaninchen gekoppelt an Meerrettich Peroxidase 1:5000 verdünnt – BCIP/NBT 10min)

Mit 70kD besitzt das Protein ein geringeres Molekulargewicht als erwartet. Diese Diskrepanz ist allerdings aufgrund der Ungenauigkeit der Methode nicht signifikant. Das Laufverhalten einer Proteinbande im Gel wird durch zahlreiche Faktoren, wie posttranslationale Modifikation oder die Zusammensetzung der Aminosäuren beeinflusst. Außerdem kann ein Protein während der Aufreinigung oder *in vivo* durch Proteasen verkürzt werden.

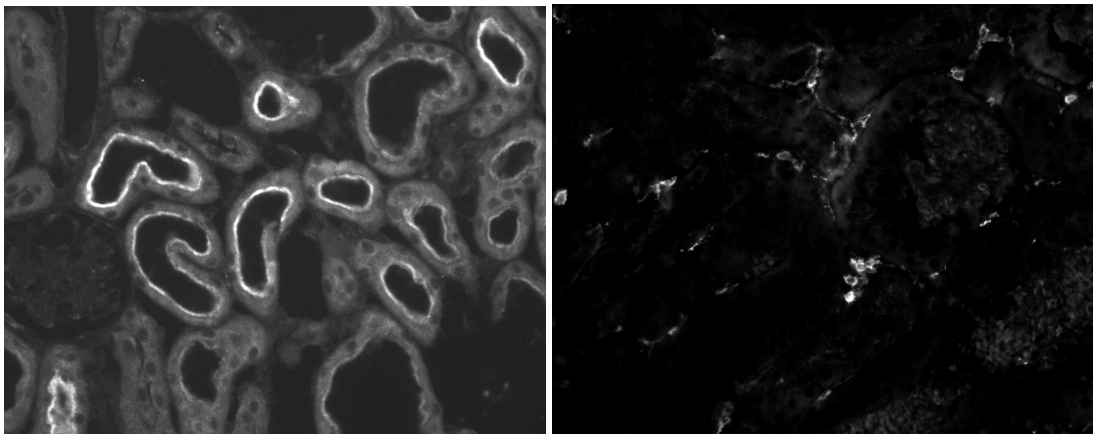
4.6.2 Immunhistochemie

Hiernach wurden immunhistochemische Schnitte der Mäuseniere angefertigt und mit dem Antikörper 2426 gegen C160 und einem Antikörper gegen den N-Terminus von NaPi-IIa untersucht. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte nach dem selben Prinzip wie die Immunhistochemie an OK-Zellen. In Abb. 29 ist deutlich erkennbar, daß C160 nicht in tubulären

Strukturen der Niere lokalisiert ist. Das Protein ist im Interstitium der Niere lokalisiert. Hier werden verzweigte Zellen angefärbt, welche eine Form wie dendritische Zellen aufweisen. Diese Zellen, welche eine wichtige Funktion in der Immunabwehr erfüllen, besitzen stark deformierte Zellkerne. Dies ist in der Kofärbung mit dem Zellkernfarbstoff DAPI deutlich zu erkennen. NaPi zeigt eine andere Lokalisation. Das Interstitium ist negativ und nur die Bürstensaummembran ist angefärbt. Obwohl C160 *in vitro* mit NaPi-IIa interagieren kann, ist nach diesen Untersuchungen jedoch in der Mäuseniere eine physiologisch relevante Interaktion in Frage zu stellen.

NaPi-IIa

C160



C160(rot) Zellkerne(blau)

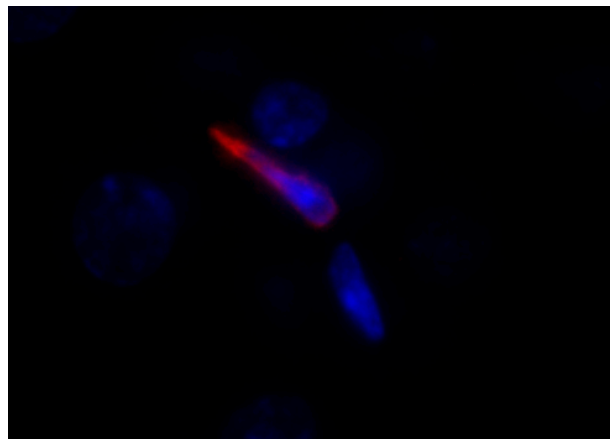


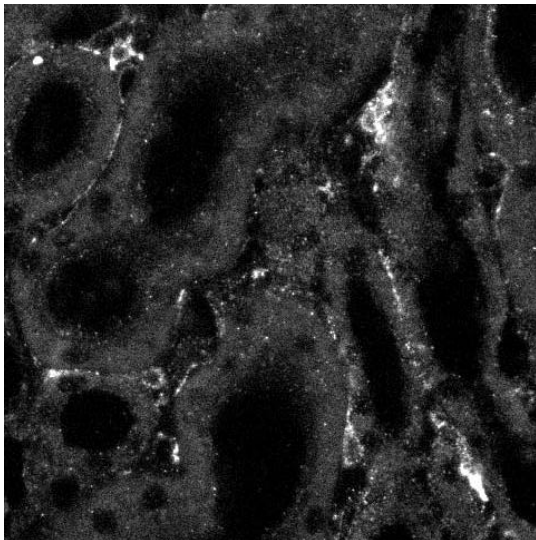
Abb. 29: Immunhistochemische Schnitte der Mäuseniere (Gefrierschnitte). Lokalisierung von NaPi-IIa in den proximalen Tubuli (Verg. x200), Lokalisierung von Shank3b im Interstitium, (Verg. x200) Kofärbung von Shank3b/C160 und der Zellkerne (DAPI) (Verg. x1000). Färbung mit Antikörpern gegen NaPi-IIa (N-Terminus 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 – 532nm) und C160 (2426 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 - 532nm)

4.7 Ergänzende immunhistochemische Untersuchungen zu C160

Die Expression von C160 in Immunzellen ist sehr überraschend und interessant. Bisher ist sehr wenig über immunspezifische PDZ-Proteine bekannt. Obwohl die Charakterisierung von C160 in Immunzellen von der ursprünglichen Fragestellung abweicht, wurde dieses Protein näher untersucht. Zunächst wurde geprüft, ob C160 in der Ratte und dem Menschen die gleiche Lokalisation zeigt, wie in der Maus. Zusätzlich gelang in diesen Spezies eine Kofärbung mit Markerproteinen, welche eine genauere Charakterisierung des Zelltyps ermöglichen.

Mit dem Antikörper 2426 konnte C160 sowohl in einem Western-Blot, auch immunhistochemisch in der Rattenniere nachgewiesen werden. Um sicher zu sein, daß der Antikörper Immunzellen detektiert, wurden die Präparate zusätzlich mit einem Antikörper gegen das Markerprotein MHCII gefärbt. MHCII ist ein Marker für eine große Subpopulation von Immunzellen. In der Niere sind vor allem dendritische Zellen positiv für MHCII. Abb. 30 zeigt eine Parallelfärbung eines Rattennierenschnitts. Beide Proteine sind unter diesen Bedingungen zu mehr als 90% auf zellulärer Ebene kolokalisiert.

C160



MHCII

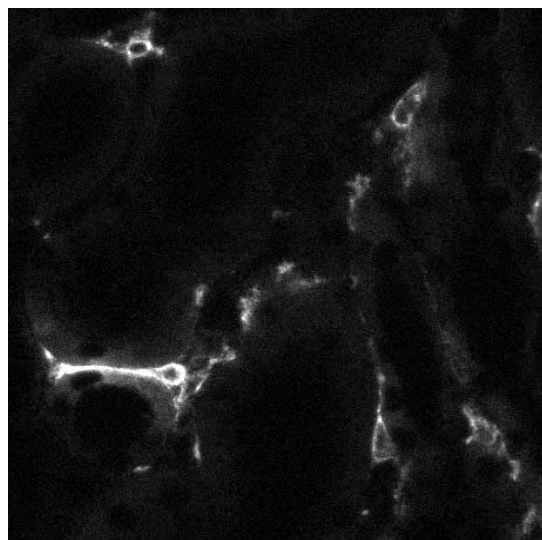
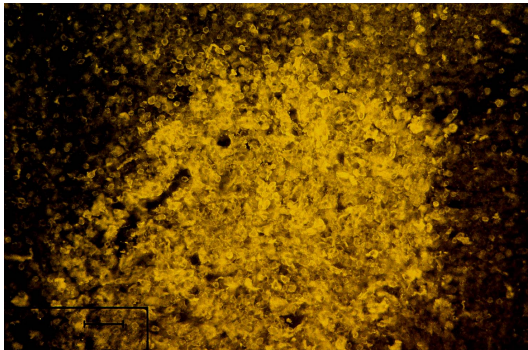


Abb. 30: Immunhistochemische Schnitte von Rattennieren. Kofärbung mit Antikörpern gegen C160 (2426 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 - 532nm) und MHC-II (Ox-6 1:200 verdünnt / Detektion über anti-Maus FITC 1:100 - 488nm) (Verg. x200)

Aufgrund der verzweigten Form und Häufigkeit im Nierengewebe wurden diese Zellen hauptsächlich als dendritische Zellen klassifiziert. Einzelne Zellen sind jedoch nur mit dem für C160 spezifischen Antikörper angefärbt und zeigen eine runde Form. Diese Zellen wurden wegen der fehlenden MHCII-Moleküle als Lymphocyten eingestuft.

Zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers wurden Peptidschutzexperimente durchgeführt. Durch Zugabe eines fünffachen Überschusses des antigenen Peptids, wurde die Antikörperbindung völlig blockiert. Um weitere Hinweise zu erhalten, ob C160 auch in anderen Organen in Immunzellen lokalisiert ist, wurden Paraffinschnitte von Thymus und Leber angefertigt. Auch in diesen Geweben konnte C160 identifiziert werden. Im Thymus ist es nur in einer Subpopulation der dort vorhandenen Lymphocyten exprimiert (Abb. 31).

x250



x100

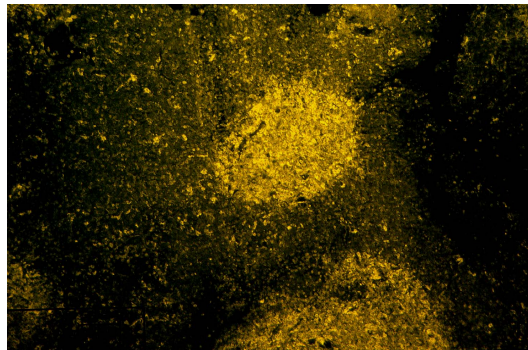


Abb. 31: Immunhistochemischer Schnitt des Rattenthymus (Paraffinschnitt). Lokalisierung von C160 in Lymphocyten des Marks. Färbung mit Antikörpern gegen C160 (2426 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 - 532nm)

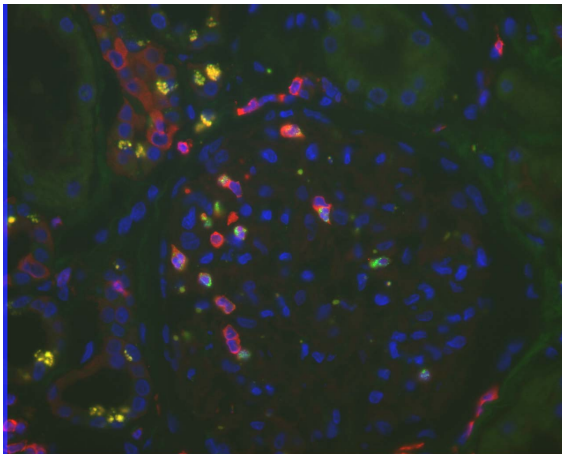
In der Leber sind hauptsächlich dendritische Zellen am Gefäßendothel angefärbt. Durch Vorinkubation der Antikörper mit dem immunogenen Peptid konnte die Bindung auch in diesen Geweben vollständig blockiert werden.

Die Expression von C160 scheint nach den immunhistochemischen Untersuchungen in der Ratte vom Reifegrad der Zellen abzuhängen. Dendritische Zellen und Lymphocyten reifen in einem mehrstufigen Prozeß zu voll ausdifferenzierten Immunzellen. Möglicherweise ist C160 nur in einem bestimmten Stadium exprimiert. Im Menschen sind zahlreiche Markerproteine für verschiedene Entwicklungsstadien dieser Zellen bekannt. Für reife dendritische Zellen ist das Markerprotein CD83 von besonderem Nutzen. Dieses Protein wird nur von dendritischen Zellen exprimiert, welche bereits ein Antigen aufgenommen haben. Nach dem Kontakt der dendritischen Zellen mit Lymphocyten wird CD83 wieder deaktiviert. Um die Subpopulation von C160 positiven

dendritischen Zellen einzuengen, wurde eine Kofärbung von C160 und CD83 auf menschlichem Nierengewebe durchgeführt.

Die für diese Untersuchungen verwendete Niere wurde im Gegensatz zur Rattenniere nicht durch Perfusion fixiert. Im Blutkreislauf können sich also folglich Immunzellen befinden. Abb. 32 zeigt einen Glomerulus, welcher zahlreiche dendritische Zellen enthält. Eine Subpopulation der Zellen ist für beide Proteine positiv. Diese Zellen befinden sich hauptsächlich innerhalb des Gefäßsystems. Außerhalb der Glomeruli sind weniger Zellen erkennbar, welche für C160 und CD83 positiv sind (C160+ CD83+).

A:



B:

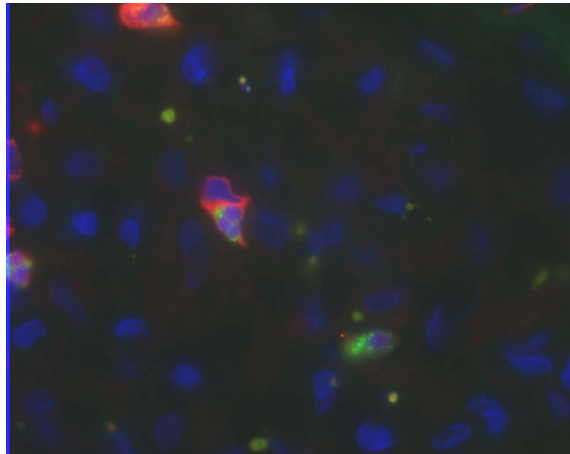


Abb. 32: A: Kofärbung von C160 (rot), CD83 (grün) mit Kernfärbung (DAPI, blau). CD83 färbt dendritische Zellen an, welche bereits Antigen aufgenommen haben, jedoch noch keinen Kontakt zu T-Zellen hatten. Die meisten C160+ Zellen befinden sich im Blutkreislauf. Eine große Subpopulation dieser Zellen ist auch für CD83 positiv – jedoch unterschiedlich stark (Verg. x250). B: Vergrößerter Ausschnitt von zwei Zellen. Eine C160+ CD83- und eine C160+ CD83+ Zelle haben Kontakt zueinander aufgenommen (Verg. x1000).

4.8 Lokalisierung von Shank2 in der Mäuseniere

Zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Lokalisation von C160 wurde eine Arbeit aus der Gruppe von Prof. Kim der Pusan National University in Korea veröffentlicht, welche verschiedene Isoformen von Shank und die gewebespezifische Verteilung der korrespondierenden mRNA beschreibt (Lim 1999). Hiernach ist die Isoform Shank3, zu der auch C160 gezählt werden muß, in allen untersuchten Geweben zu einem geringen Teil exprimiert. Das Transkript ist jedoch in Herz, Gehirn und Milz angereichert. Aufgrund der hohen Homologie zu Shank3 wurde der Klon C160 im folgenden zu Shank3b umbenannt.

Die Shank2 mRNA ist nach Lim et. al. im Gehirn, der Niere und der Leber angereichert (Lim 1999). Das Expressionsmuster von Shank2 stimmt viel besser mit der Expression des Na⁺/Phosphat Kotransporters überein. Da die PDZ-Domänen der verschiedenen Isoformen von Shank eine vergleichbare Spezifität in der Bindung zu C-terminalen Sequenzen besitzen (Naisbitt 1999) ist es möglich, daß Shank2 ein physiologisch relevanter Interaktionspartner für NaPi-IIa ist. Wenn dies der Fall sein sollte, muß Shank2 in der Bürstensaummembran von Epithelzellen des proximalen Tubulus lokalisiert sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden immunhistochemische Experimente mit einem Antikörper gegen Shank2 durchgeführt. Durch eine Kooperation mit Prof. E. Kim wurde der Antikörper 3858 erhalten, welcher durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem GST-Fusionsprotein der SH3-Domäne und der PDZ-Domäne von Shank2 der Ratte hergestellt wurde. Zur Überprüfung, ob dieser Antikörper auch Shank2 der Maus detektieren kann, wurde zunächst ein Western-Blot angefertigt.

4.8.1 Western-Blot

Analog zur Untersuchung von C160 wurde der Antikörper 3858 gegen Shank2 eingesetzt. Der Western-Blot zeigt in der Bürstensaummembranfraktion mehrere Banden zwischen ca. 110kD und 240kD (Abb. 33)

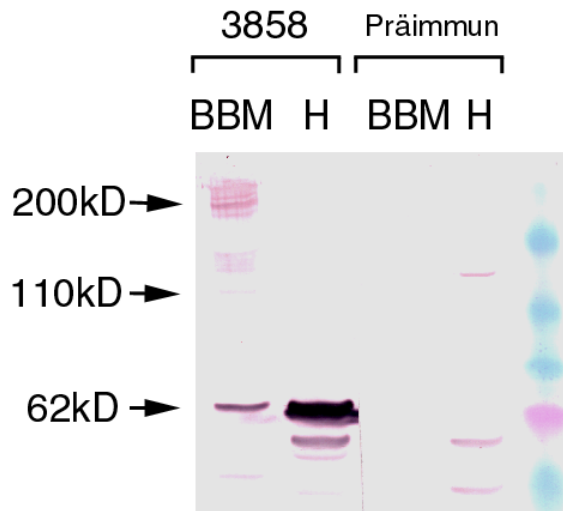


Abb. 33: Western-Blot von fraktionierten Mäusenieren - 10%iges Tris/Tricin Polyacrylamidgel BBM: Bürstensaummembranen, H: Homogenat - Inkubation mit einem Antikörper gegen Shank2 (3858 1:2000 verdünnt / Detektion mit anti-Kaninchen gekoppelt an Meerrettich Peroxidase 1:5000 verdünnt – BCIP/NBT 10min) jeweils 20µg Protein

Dies stimmt sehr gut mit dem Muster von Shank1 und Shank2 im Gehirn überein (Lim 1999). Im Gegensatz zu den Untersuchungen zu C160 sind diese Banden in der Bürstensaummembran-Fraktion angereichert. Im Homogenat ist eine sehr intensive Bande bei ca. 62kD zu sehen. Diese Bande gehört möglicherweise zu einer extrem verkürzten Spleißform von Shank2. Ein Abbauprodukt ist jedoch auch denkbar.

4.8.2 Immunhistochemie

Zur genauen Analyse der Lokalisation von Shank2 wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden Gefrierschnitte von perfusionsfixiertem Nierengewebe verwendet. In Abb. 34 ist klar zu erkennen, daß Shank2 im Bürstensaum von Epithelzellen des proximalen Tubulus angereichert ist. Die Abschnitte P1 und P2 sind hier besonders stark gefärbt. Bei höherer Vergrößerung ist eine Anreicherung in der Basis der Bürstensaummembran erkennbar. Eine schwache Färbung ist jedoch auch im Abschnitt P3 im Nierenmark detektierbar. Hier sind zusätzlich Bereiche in Tubuli angefärbt (möglicherweise die dünne aufsteigende Henlesche Schleife). Zum Vergleich wurde die Verteilung des Na⁺/Phosphat Kotransporters in einem Parallelschnitt untersucht. Die Färbung von Shank2 stimmt mit der Lokalisation des Na⁺/Phosphat-Kotransporters sehr gut überein.

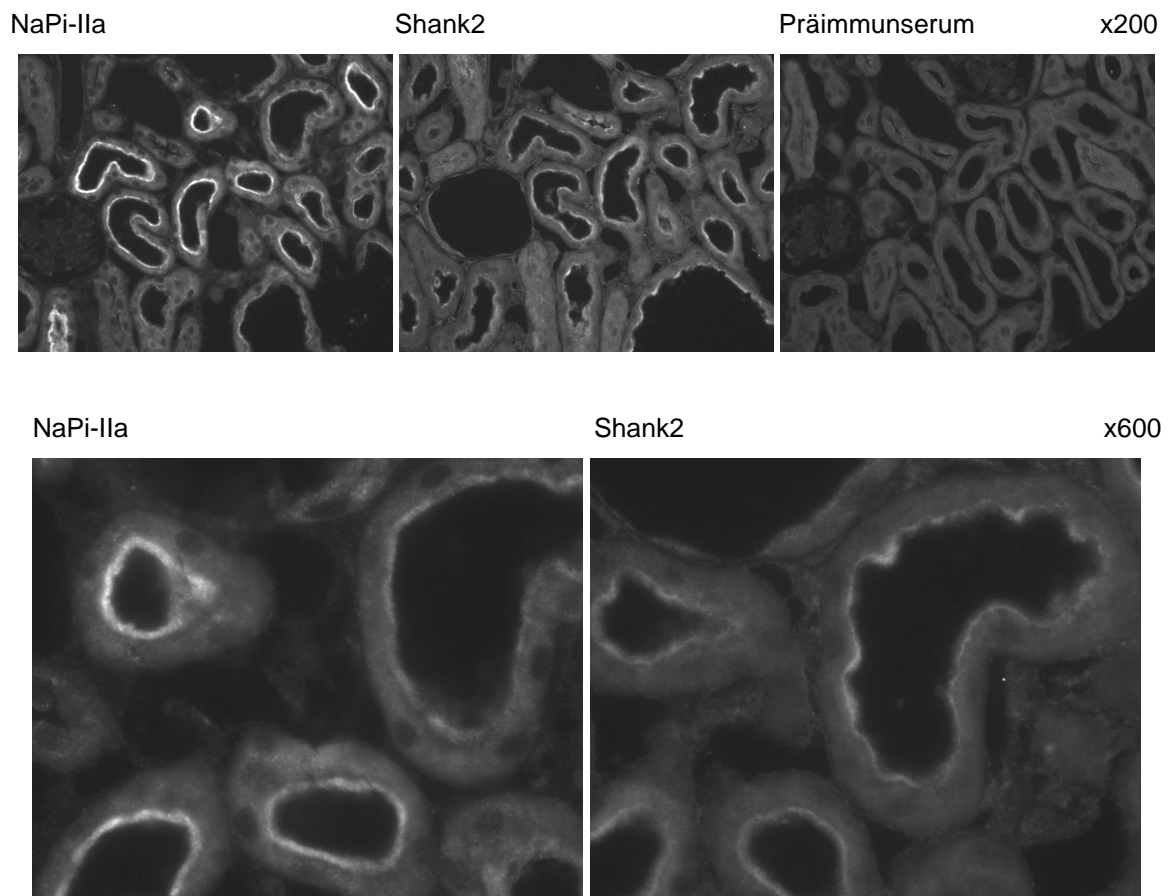


Abb. 34: Immunhistochemische Schnitte der Mäuseniere (Gefrierschnitte). Lokalisierung von NaPi-IIa und Shank2 in den proximalen Tubuli. (Verg. x200 und x600) Färbung mit Antikörpern gegen NaPi-IIa (N-Terminus 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 – 532nm) und Shank2 (3858 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 - 532nm)

4.9 Lokalisierung von Shank2 in der Rattenniere

Die Ratte ist als Modellsystem für Untersuchungen zur Regulation des Na⁺/Phosphat-Kotransporters vom Typ IIa gut etabliert. Insbesondere immunhistochemische Untersuchungen vorbehandelter Ratten haben wichtige Erkenntnisse über den zeitlichen und räumlichen Ablauf der Regulation des Transporters hervorgebracht. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Shank2 auch in dieser Spezies exprimiert ist.

4.9.1 Western-Blot Analysen

Analog zur Untersuchung in der Mäuseniere wurde der Antikörper 3858 gegen Shank2 eingesetzt. Für den Western-Blot wurde hier das Gesamthomogenat und eine Plasmamembranfraktion verwendet. Der Western-Blot zeigt ebenfalls ein Bandenmuster zwischen 110kD und 240kD in der Membranfraktion. Hier fällt jedoch zusätzlich eine deutliche Bande bei 110kD auf, welche in der Plasmamembranfraktion angereichert ist (Abb. 35).

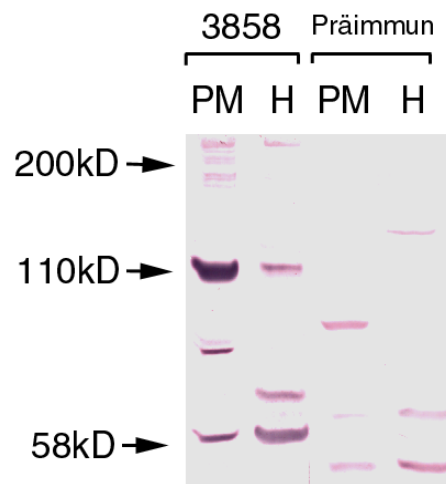


Abb. 35: Western-Blot von fraktionierten Rattennieren - 10%iges Tris/Tricin Polyacrylamidgel P: Poolfraktion, PM: Plasmamembranen, H: Homogenat - Inkubation mit einem Antikörper gegen Shank2 (3858 1:2000 verdünnt / Detektion mit anti-Kaninchen gekoppelt an Meerrettich Peroxidase 1:5000 verdünnt – BCIP/NBT 10min) jeweils 20µg Protein

4.9.2 Immunhistochemie an Rattenschnitten

Zur Bestimmung der Lokalisation von Shank2 in der Ratte wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. In diesem Fall wurden Paraffinschnitte verwendet. Das Protein ist auf Nierenschnitten detektierbar. Hier ist Shank2 in der Bürstensaummembran von Epithelzellen des proximalen Tubulus stark angereichert (Abb. 36).

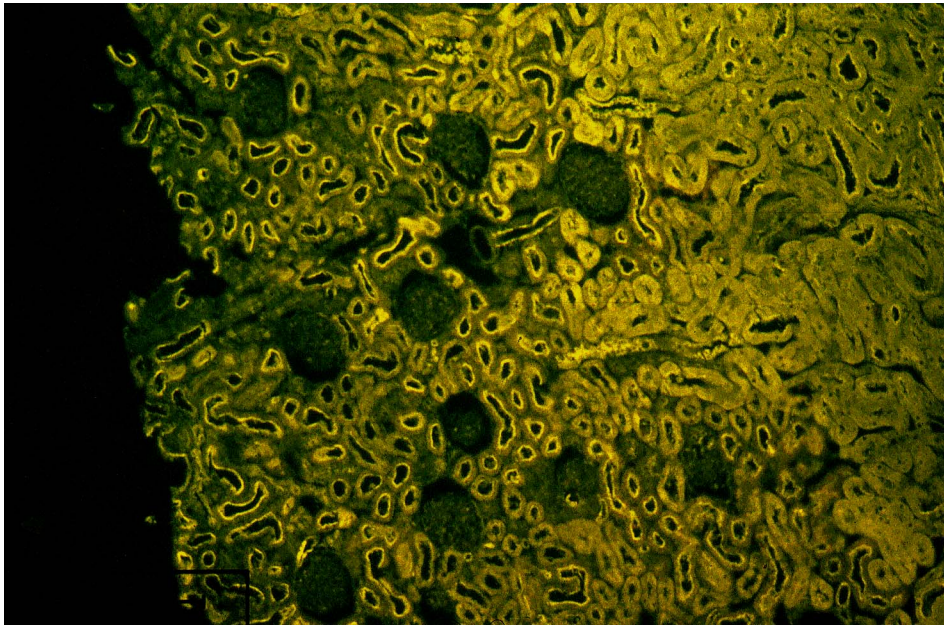


Abb. 36: Immunhistochemischer Schnitt der Rattenniere (Paraffinschnitt). Lokalisierung von Shank2 in den proximalen Tubuli (Verg. x100). Färbung mit Antikörpern gegen Shank2 (3858 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 - 532nm)

Wie in der Maus sind die Abschnitte P1 und P2 in der Nierenrinde besonders stark gefärbt. Eine schwächere Färbung ist jedoch auch im Abschnitt P3 im Nierenmark detektierbar. Auch in der Ratte stimmt die Färbung von Shank2 mit der Lokalisation des Na⁺/Phosphat-Kotransporters überein. Außerdem sind noch Strukturen in der Papille angefärbt. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um das Cytosol von Sammelrohrzellen (nicht gezeigt). Diese Färbung ist allerdings nur im Vergleich mit dem Präimmunserum erkennbar.

Da Shank2 auch in der Leber exprimiert wird (Lim 1999), wurden auch von diesem Gewebe Paraffinschnitte angefärbt. Abb. 37 zeigt eine deutliche Färbung der Canaliculi. In allen Experimenten sind die Kontrollen mit Präimmunserum negativ.

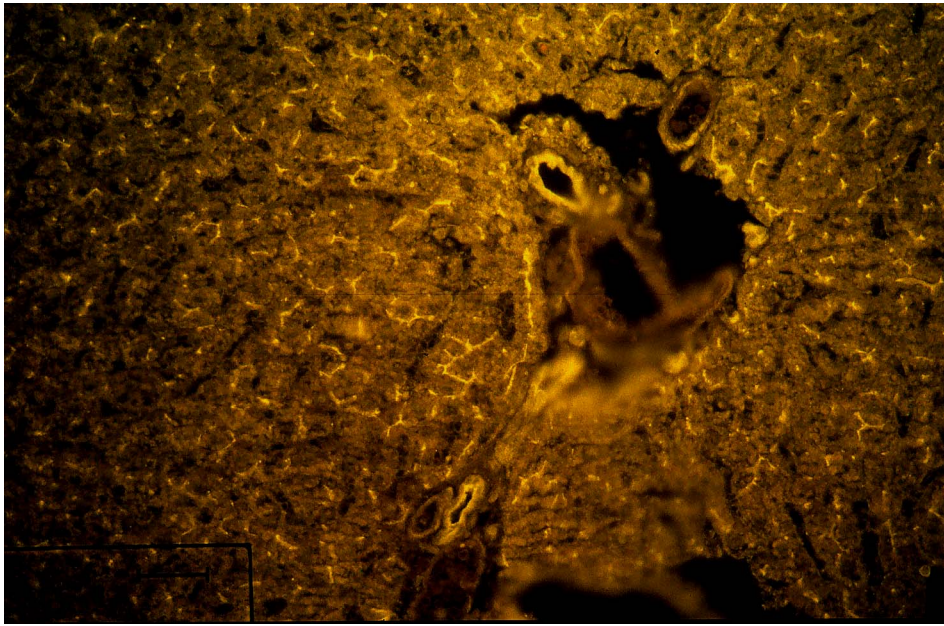


Abb.37: Immunhistochemischer Schnitt der Rattenleber (Paraffinschnitt). Lokalisierung von Shank2 in den Canaliculi. (Verg. x250) Färbung mit Antikörpern gegen Shank2 (3858 1:500 verdünnt / Detektion über anti-Kaninchen Cy3 1:1000 - 532nm)

Shank2 besitzt nach diesen Experimenten eine epitheliale Lokalisation in den untersuchten Organen. Im Gegensatz zu Shank3b/C160 ist diese Isoform hiermit ein guter Kandidat für eine Interaktion mit NaPi-IIa. Die Kolo-kalisation mit NaPi-IIa gibt einen weiteren Hinweis auf eine funktionelle Interaktion der beiden Proteine.

5 Diskussion

Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Befunde ist Shank ein sehr aussichtsreicher Kandidat als Interaktionspartner für den Na⁺/Phosphat Kotransporter. Zum Zeitpunkt des Two-Hybrid Screens waren jedoch noch keine Informationen über die Isoformen Shank1, Shank2 oder Shank3 veröffentlicht. Deshalb konnte zunächst nur die isolierte PDZ-Domäne von Shank3b/C160 untersucht werden. Die direkte molekulare Interaktion von dem NaPi-IIa C-Terminus mit der Shank3b/C160-PDZ-Domäne kann durch das komplexe und artifizielle Two-Hybrid System nicht bewiesen werden. Es ist immer möglich, daß ein drittes Protein aus der Hefe eine vermittelnde Rolle in der Interaktion spielt. Deshalb ist es nötig, die Interaktion durch eine zweite unabhängige Methode zu bestätigen. Hierfür wurden die beiden Interaktionspartner als Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Durch einen Blot-Overlay wurde die direkte Interaktion von Shank3b/C160-PDZ mit dem C-Terminus von NaPi-IIa nachgewiesen. Mit Hilfe einer Konzentrationsreihe wurde eine Dissoziationskonstante K_d von ca. 2nM abgeschätzt. Die Wechselwirkung ist unter diesen Bedingungen hochaffin. Dadurch, daß der Blot über einen längeren Zeitraum gewaschen wurde, gelten für die Interaktion jedoch keine Gleichgewichtsbedingungen. Ein geringer Teil des gebundenen Proteins kann in dieser Zeit vom Blot abgewaschen werden und hiermit das Signal schwächen. Man kann aus diesem Grund die Dissoziationskonstante der Interaktion nur abschätzen. Durch die hohe Affinität ist der Fehler jedoch gering.

Die korrespondierende mRNA des Klons wurde durch RT-PCR in allen untersuchten Geweben identifiziert. Auch in der Niere ist ein deutliches Signal detektierbar. Aus diesem Befund wurde geschlossen, daß Shank3b/C160 eine allgemeinere Funktion hat. Um Hinweise auf die Funktion des Proteins zu erhalten, wurden zwei wichtige Hilfsmittel benötigt: i) die vollständige cDNA-Sequenz ii) ein spezifischer Antikörper.

Die Isolierung eines vollständigen Klons war schwieriger als erwartet. In einer käuflichen cDNA-Bibliothek aus der Mäuseniere war der Klon nur mit der sehr geringen Häufigkeit von 1:1 000 000 vertreten. Durch eine PCR-Strategie konnte dennoch ein partieller Klon aus dieser Bibliothek isoliert werden, welcher jedoch kein Startkodon aufwies. Durch verschiedene 5'-RACE Versuche wurden zunächst in Vorversuchen zahlreiche alternativ gespleißte Varianten und Artefakte isoliert, welche nicht zu sinnvollen Proteinen übersetzt werden konnten. Durch die Kombination von zwei RACE-Methoden wurde jedoch ein sinnvolles Fragment isoliert. Ausgehend von diesem Fragment wurde ein vollständiger Klon konstruiert. Shank3b/C160 besitzt als alternative Spleißform von Shank3/ProSAP2 ein modifiziertes 5'- und 3'-Ende. Hierdurch wird ein alternatives Protein

gebildet, welches sich nur in wenigen N-terminalen Aminosäuren von Shank3a unterscheidet. Der C-Terminus ist hingegen durch ein alternativ gespleißtes Stop-Codon stark verkürzt. Hierdurch fehlt die SAM-Domäne und ein großer prolinreicher Abschnitt.

Zum direkten Nachweis von Shank3b/C160 auf Proteinebene wurde der Antikörper 2426 hergestellt. Mit Hilfe von Western-Blots konnte hiermit Shank3b/C160 in der Maus, Ratte und OK-Zellen detektiert werden. Das Molekulargewicht des Proteins unterscheidet sich in den verschiedenen Spezies kaum und stimmt innerhalb der Genauigkeit der Methode mit dem vorhergesagten Molekulargewicht für Shank3b/C160 überein. Es konnte jedoch keine Anreicherung in der Plasmamembranfraktion der Zellen detektiert werden. Dies ist vermutlich auch der Grund, warum das Protein in OK-Zellen nicht durch immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden konnte. Die lokale Konzentration des Proteins ist in den Zellen vermutlich zu gering und eine immunhistochemische Detektion schwierig oder nicht möglich. Um die Konzentration des Proteins in diesen Zellen zu erhöhen, wurde Shank3b/C160 der Maus zusammen mit dem Na⁺/Phosphat Kotransporter NaPi-IIa der Maus heterolog exprimiert. Beide Proteine konnten durch konfokale Aufnahmen in der Plasmamembran lokalisiert werden. Dort sind sie in der Bürstensaummembran angereichert und kolokalisiert. Aus diesen Befunden kann nicht zwangsläufig auf eine molekulare Interaktion der beiden Proteine geschlossen werden. Die Proteine befinden sich jedoch in dem selben Kompartiment. Eine Interaktion der beiden Proteine ist hiermit möglich.

Zu dieser Zeit wurde die erste gründliche Charakterisierung der Proteinfamilie Shank veröffentlicht (Lim et al 1999). Durch Northern Blots wurde in dieser Publikation gezeigt, daß die Isoform Shank1 nur im Gehirn und Shank2 in Gehirn, Niere und Leber detektierbar ist. Die Isoform Shank3 kommt hingegen im Herz, im Gehirn, in der Milz und zu einem geringeren Teil in Lunge, Leber, Muskel, Niere und Hoden vor. Da Shank3 in der Milz angereichert ist, deutet dies auf eine Expression in Immunzellen hin. Durch immunhistochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten wurde diese Isoform in Immunzellen, hauptsächlich dendritischen Zellen, lokalisiert. NaPi-IIa ist nur in Zellen des proximalen Tubulus der Niere exprimiert, jedoch nicht in dendritischen Zellen. Shank3b/C160 kann daher unter physiologischen Bedingungen nicht als Interaktionspartner für den Na⁺/Phosphat Kotransporter fungieren. Shank2 ist durch die hohe Anreicherung in der Niere und die große Ähnlichkeit zu Shank3b/C160 ein potentieller Kandidat für eine relevante Interaktion mit NaPi-IIa. Die PDZ-Domänen beider Proteine sind zu 85% identisch und beide Proteine sind in der Lage ein NaPi-IIa ähnliches C-terminales Peptidmotiv zu erkennen (T/S-x-L). In Abb. 38 ist ein Vergleich verschiedener PDZ-Domänen gezeigt. Die Aminosäuren, welche die hydrophobe Bindungstasche für C-terminale Peptide bilden, sind hervorgehoben. Die gute Übereinstimmung in den relevanten Aminosäuren verdeutlicht die ähnliche Spezifität der PDZ-Domänen der drei Shank-Isoformen.

```

GLGF          variabler Loop
Shank3-PDZ_mouse  EGFGFVLRGAKAETPIEEFTPTPAFPALQYLESVDVEGVAVRAGLRTGDFLIEVNGVNVV 60
Shank3-PDZ_rat    EGFGFVLRGAKAETPIEEFTPTPAFPALQYLESVDVEGVAVKAGLRTGDFLIEVNGVNVV 60
Shank2-PDZ_rat    EGFGFVLRGAKADTPIEEFTPTPAFPALQYLESVDEGGVAWQAGLRTGDFLIEVNNENVV 60
Shank1-PDZ_rat    EGFGFVLRGAKAQTPIEEFTPTPAFPALQYLESVDEGGVAWRAGLRMGDFLIEVNGQNVV 60

nherf-PDZ1_human  -GYGFHLHGEKGK-----LG---QYIRLVEPGSPA EKAGLLAGDRLVEVNGENVE 46
diphor-PDZ1_rat   -NYGFFLRIEKDT-----DG---HLVRVIEEGSPA EKAGLLDGRVLRIRKRVFVD 46
psd95-PDZ1_mouse  SGLGFSIAGGTDNPHIG-----DDPSIFITKIIPGGAAAQDGRLRVND SILFVNEVDVR 54
afadin_rat        -GMGLSIVAAKGAGQ-----DKLGIYVKS VVKGGAADVDGRLAAGDQLLSVDGRSLV 51
. *: : . : . : * . * : : . :

Shank3-PDZ_mouse  KVGHKQVVGLIRQGGNRLVMKVVSVT---- 86
Shank3-PDZ_rat    KVGHKQVVGLIRQGGNRLVMKVVSV----- 85
Shank2-PDZ_rat    KVGHRQVVNMIRQGGNHLVVKVVTVT---- 86
Shank1-PDZ_rat    KVGHRQVVNMIRQGGNTLMVKVVMVTRHPD 90

nherf-PDZ1_human  KETHQQVVSRI RAALNAVRLLVVDPE---- 72
diphor-PDZ1_rat   KEEHAQVVDLVRKSGNSVTLLVLDGD---- 72
psd95-PDZ1_mouse  EVTHSAAVEALKEAGSIVRLYVMRRK---- 80
afadin_rat        GLSQERAAELMTRTSSVVTLEVAKQG---- 77
: .. : . : : *

```

Abb. 38: Vergleich verschiedener PDZ-Domänen auf Sequenzebene. Aminosäuren, welche nach (... 1998) mit dem C-terminalen Peptid interagieren, sind hervorgehoben.

5.1 Shank2

Zur Untersuchung der Lokalisation von Shank2 wurde eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Kim von der Pusan National University of Korea initiiert. Unveröffentlichte Daten dieser Arbeitsgruppe deuten auf eine Interaktion von Shank2 mit dem Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) hin. Der C-Terminus dieses Proteins (**D-T-R-L-COOH**) ist dem C-Terminus des Na⁺/Phosphatkotransporters NaPi-IIa (**A-T-R-L-COOH**) sehr ähnlich. Die Arbeitsgruppe von Kim hat zahlreiche Antikörper gegen verschiedene Isoformen von Shank hergestellt. In Vorversuchen hat der Antikörper 3858 gegen die SH3- und PDZ-Domäne von Shank2 ein eindeutig positives Signal in Western-Blots und Immunhistochemie gezeigt. Durch eine gründliche Untersuchung des Antikörpers auf Gefrier- bzw. Paraffinschnitten von tierischem Gewebe konnte das entsprechende Signal in der Bürstensaummembran von Zellen des proximalen Tubulus der Maus und der Ratte identifiziert werden.

Nach den Western-Blots von Maus und Ratte sind zahlreiche Spleißformen von Shank2 in der Niere exprimiert. Die Banden bei hohem Molekulargewicht (>120kD) entsprechen etwa der Größe von Shank2 im Gehirn. Ob die besonders intensiven Banden (62kD bei der Maus bzw. 110kD bei der Ratte) einzelnen Spleißformen zugeordnet werden können, oder ob diese durch Degradation des Proteins entstehen, ist nicht unterscheidbar.

Durch eine Kofärbung von Maus- und Rattennierenschnitten wurde gezeigt, daß NaPi-IIa und Shank2 in den selben Tubulusabschnitten exprimiert sind. In weiterführenden Experimenten konnte Shank2 zusätzlich in den Canaliculi der Leber, sowie im luminalen Bereich der Gallengänge detektiert werden. Obwohl durch die Kolokalisation von NaPi-IIa mit Shank2 in der Niere noch kein Beweis für eine direkte Interaktion der beiden Proteine geliefert wird, sprechen alle bisherigen experimentellen Resultate für einen funktionellen Zusammenhang zwischen Shank2 und NaPi-IIa. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß Shank2 ausschließlich mit NaPi-IIa interagiert. Da die C-terminalen Motive verschiedener Membranproteine in der Niere sehr ähnlich sind (CFTR, β -adrenerger Rezeptor, NaPi-IIa) und Shank2 nicht ausschließlich in den proximalen Tubuli lokalisiert ist, hat Shank2 möglicherweise eine allgemeinere Funktion in Epithelzellen. Hierüber kann im Moment nur spekuliert werden, da noch keine Daten über Shank2 in der Niere publiziert wurden. Die Untersuchungen der anderen Isoformen von Shank können jedoch wichtige Hinweise auf die Funktion von Shank2 liefern.

5.2 Shank3b/C160

Um die biologische Funktion von Shank3b/C160 einzugrenzen, wurden zunächst weitere immunhistochemische Experimente durchgeführt. In Herz und Leber ist Shank3b/C160 wie in der Niere hauptsächlich in dendritischen Zellen lokalisiert. Im Thymus einer jungen Ratte sind die Lymphocyten des Marks angefärbt - Lymphocyten in der Rinde sind negativ. Für eine Funktion von Shank3b/C160 in Immunzellen kommen vor allem zwei wichtige Bereiche in Frage: i) Die Migration ii) Funktionen in der Immunantwort (z. B. Exo- bzw. Endocytose von Signalstoffen oder Rezeptoren).

Dendritische Zellen und Lymphocyten migrieren *in vivo* und in dreidimensionaler Gewebekultur. Die Migrationsrichtung wird von Cytokinen gelenkt, welche über Rezeptoren an der Plasmamembran der Zellen wirken. Die Migration selbst erfordert eine radikale, regulierte Umordnung des Cytoskeletts, eine ausgeprägte Polarisierung der Zelle und effektive Sortierungsmechanismen, welche die durch die Migration bewegten Rezeptoren zu ihrem Ausgangsort zurückbringen. Die Transfektion von Shank3b/C160 in OK-Zellen induziert die Bildung von Wachstumskegeln. Dieser Prozeß erfordert auch eine regulierte Umordnung des

Cytoskeletts. Jedoch konnte in verschiedenen Vorversuchen kein Hinweis auf eine Beteiligung von Shank3b/C160 in der Migration gefunden werden. Diese Vorversuche basieren jedoch auf Experimenten in Gewebekultur, in welchen zahlreiche extrazelluläre Stimuli fehlen. Die exklusive Expression von Shank3b/C160 in Lymphocyten des Thymusmarks gibt jedoch einen Hinweis auf die Abhängigkeit der Expression vom Differenzierungszustand. Zellen, welche für CD83 (Marker für aktivierte dendritische Zellen nach der Aufnahme eines Antigens aber vor dem Kontakt mit T-Zellen) positiv sind, exprimieren geringe Mengen von Shank3b/C160. Die Subpopulation von Zellen, welche negativ für CD83, aber positiv für Shank3b/C160 sind, zeigt eine stärkere Färbung für Shank3b/C160, möglicherweise an der Plasmamembran angereichert. Welche Stimuli hierfür eine Rolle spielen und welche Funktion Shank3b/C160 hierbei spielt, ist noch unklar. Es ist beispielsweise möglich, daß Shank3b/C160 eine Rolle in der Reorganisation von membrangebundenen Rezeptoren während der Differenzierung dieser Zellen spielt. Auch eine Rolle in der Sekretion von Cytokinen oder anderen Botenstoffen ist denkbar. Auch wenn es sich hierbei um Spekulationen handelt, sind mögliche Parallelen zu Sortiermechanismen des Na⁺/Phosphatkotransporters NaPi-IIa vorhanden.

5.3 Shank1

Die Isoform Shank1 wurde vor allem in Neuronen untersucht (Naisbitt et al 1999, Tu et al 1999, Boeckers, 1999, Zitzer, 1999). Hier bildet dieses Protein, möglicherweise zusammen mit Shank3 (Tu et al 1999), ein Gerüst für Synapsen. Die PDZ-Domäne von Shank1 interagiert dort indirekt über die Adapterproteine GKAP und PSD95 mit NMDA-Rezeptoren (Naisbitt 1999). Über eine prolinreiche Erkennungssequenz wird Shank durch eine Interaktion mit Cortactin an dem Aktincytoskelett verankert (Naisbitt 1999). Cortactin ist ein F-Aktin bindendes Protein, welches von der Kinase Src phosphoryliert wird (Wu 1993). Es wird mit der Reorganisation des Cytoskeletts, hervorgerufen durch verschiedene zelluläre Stimuli, in Verbindung gebracht und ist auch in dem Bürstensaum von proximalen Tubuluszellen exprimiert. Die SAM-Domäne führt möglicherweise zur Dimerisierung von Shank. Über mögliche Interaktionspartner der SH3-Domäne und der Ankyrin-repeats ist noch nichts bekannt. Es ist jedoch möglich, daß diese Domänen des Proteins mit intramolekularen Bindungsstellen interagieren.

In einem heterologen Zellsystem konnte in einem anderen Fall eine funktionelle Verbindung zwischen regulativen Signalen und der Interaktion mit Shank nachgewiesen werden. Durch die Bindung von Somatostatin an den Somatostatinrezeptor SSTR2 wird dieser aktiviert. Gleichzeitig ist eine Verschiebung von Shank1 aus dem Cytosol zur Plasmamembran zu beobachten (Zitzer, 1999). Möglicherweise steht dieser Effekt mit der folgenden endocytotischen Deaktivierung des Rezeptors in Zusammenhang. Obwohl dies eine Studie in einem heterologen Zellsystem ist und

der Somatostatinrezeptor im Gegensatz zu dem Na⁺/Phosphatkotransporter NaPi-IIa nach der Deaktivierung zum größten Teil reaktiviert wird (Koenig, 1998), sind in diesem Fall deutliche Parallelen zur Regulation von dem Na⁺/Phosphat Kotransporter NaPi-IIa vorhanden.

5.4 Bewertung der Informationen zur Proteinfamilie Shank

Durch eine große Zahl verschiedener Isoformen, welche durch alternatives Spleißen weiter erhöht wird, sind die momentanen Publikationen und den präsentierten Ergebnisse sehr vorsichtig zu bewerten. Kreuzreaktivitäten zwischen Antikörpern gegen einzelne Isoformen sind vermutlich die größte Fehlerquelle in solchen Experimenten. Im Falle des Antikörpers 2426 gegen Shank3b/C160 ist durch die Wahl eines kurzen Peptidmotivs, welches in den anderen Isoformen nicht vorkommt, eine hohe Subtypspezifität sichergestellt. Die Kontrollen in der Immunhistochemie und im Westernblot dokumentieren die Spezifität dieses Antikörpers. Es ist jedoch möglich, daß eine alternative Shank3-Variante dieses Motiv nicht besitzt und folglich nicht detektiert werden kann. Eine solche Variante kann prinzipiell auch in anderen Zelltypen der Niere, wie beispielsweise in Epithelzellen, vorkommen. Im Falle des Antikörper 3858 gegen Shank2 müssen die Ergebnisse dieser Untersuchungen sorgfältig analysiert werden, um Fehlschlüsse zu vermeiden. Dieses Antiserum ist nicht gegen ein kurzes Peptidmotiv gerichtet, sondern erkennt einen großen Bereich von Shank2: die SH3-Domäne, die PDZ-Domäne und wenige flankierende Aminosäuren. Da die Domänen zwischen den verschiedenen Isoformen sehr gut konserviert sind, ist eine Kreuzreaktivität durchaus möglich. Prinzipiell sind in der Niere zwei Isoformen von Shank exprimiert: Shank2 und Shank3. Eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit Shank3 ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da heterolog exprimiertes Shank3 der Ratte nicht erkannt wird (Lim, 1999). Ob dies auch für Shank3 der Maus gilt, ist nicht bekannt. Dies könnte auch die Unterschiede im Bandenmuster von Shank2 der beiden Spezies erklären. Die bereits dokumentierte Kreuzreaktivität von 3858 mit Shank1 (Lim 1999) sollte keine Rolle spielen, da diese Isoform nicht in der Niere nachgewiesen wurde.

5.5 Die luminalen Sortierung von Shank

Die Lokalisation von Shank in den verschiedenen Zelltypen entspricht jeweils einer luminalen Sortierung. In den proximalen Nierentubuluszellen ist dies die Bürstensaummembran, in der Leber die Canaliculi bzw. die luminalen Membran der Gallengänge. In Neuronen sind die Sortiermechanismen, welche Proteine in die postsynaptische Membran befördern, sehr ähnlich zu denen, welche Proteine zur luminalen Membran von Epithelzellen transportieren. In Immunzellen hängt die Polarisation der Zelle von der Bewegungsrichtung ab. Hier ist eine eindeutige Bewertung der subzellulären Lokalisation von Shank aufgrund der immunhistochemischen Daten

schwierig. Die Heterogenität der Zellen in ihren verschiedenen Aktivierungszuständen läßt keine klaren Aussagen zu. Möglicherweise ist Shank an den Sortierprozessen in der Zelle aktiv beteiligt. Es sind bereits mehrere Beispiele bekannt, in denen PDZ-Domänen enthaltene Proteine als Sortierungssignale für Membranproteine fungieren.

5.6 Die Bedeutung von Shank für die Sortierung und Regulation von NaPi-IIa

Ausgehend von den präsentierten Untersuchungen kann Shank als typisches Adapterprotein bezeichnet werden. Es stellt eine Verbindung zwischen membrangebundenen Rezeptoren bzw. Transportern und dem Cytoskelett, sowie regulatorischen Proteinen dar. Solch eine Verbindung ist auch für die korrekte Sortierung des Na⁺/Phosphat Kotransporters nötig – insbesondere in der aktiven Umsortierung nach regulativen Stimuli.

Die molekulare Identifizierung von C160 hat die Verwandtschaft eines Interaktionspartners zur Proteinfamilie Shank gezeigt. Diese Familie ist weit verbreitet und möglicherweise in der luminalen Sortierung von Membranproteinen involviert. Die Kolo-kalisation von Shank2 und NaPi-IIa wurde immunhistochemisch nachgewiesen, eine Überlappung der Spezifität verschiedener PDZ-Domänen ist jedoch möglich. Ausserdem gibt es neben NaPi-IIa eine Reihe von Proteinen, welche *in vitro* und möglicherweise auch *in vivo* mit Shank2 interagieren. Für die hohe Spezifität der Regulation von NaPi-IIa sind daher weitere molekulare Faktoren nötig, welche in diesem Screen nicht identifiziert wurden. Das Minimalkriterium für eine molekulare Interaktion der beiden Proteine *in vivo* ist mit der Kolo-kalisation erfüllt, die Regulation von NaPi-IIa ist jedoch ein dynamischer Prozess, in welchem einzelne Interaktionen gelöst und neu gebildet werden. Möglicherweise kann die Bindung von Shank an membrangebundene Proteine durch eine intramolekulare Interaktion zwischen den Proteindomänen reguliert werden. Für die aktive selektive Endocytose ist solch eine regulierte Bindung nötig. Da die Proteinkinasen A und C in der Regulation von NaPi-IIa eine wichtige Rolle spielen, ist jedoch die Phosphorylierung von Proteinen in diesem Prozess mit Sicherheit involviert. Es ist bereits bekannt, daß die Phosphorylierung von C-terminalen PDZ-Bindungsmotiven die Interaktion mit PDZ-Domänen regulieren kann (Adey 2000). Zur Identifizierung molekularer Interaktionspartner wurde das Two-Hybrid System verwendet. Da dieses ein artifizielles System ist und nicht die reale Umgebung der Interaktionspartner mit allen zusätzlichen Faktoren wie Kinasen und Effektoren widerspiegelt, können nicht alle möglichen Interaktionen identifiziert werden. Insbesondere die Interaktionen, welche eine posttranslationale Modifikation der Bindungspartner erfordern, werden nicht erkannt.

6 Zusammenfassung

Der Na⁺/Phosphat Kotransporter NaPi-IIa spielt eine wichtige Rolle in der Phosphathomöostase von Vertebraten. Insbesondere die stark polarisierte Sortierung des Proteins zur luminalen Membran, als auch die Regulation des Proteins durch verschiedene Stimuli erfordert spezifische Interaktionen mit Adapterproteinen. Ziel der Arbeit war die Identifizierung und molekulare Charakterisierung eines Bindungspartners von NaPi-IIa. Mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens gelang es, die PDZ-Domäne des Proteins C160 aufgrund einer Wechselwirkung mit dem C-Terminus des Na⁺/Phosphat Kotransportsystems NaPi-IIa der Maus zu identifizieren. PDZ-Domänen erkennen unter anderem ein C-terminales Motiv mit der allgemeinen Konsensussequenz S/T-X-V/L/I-COOH. Dieses Motiv ist auch in den C-terminalen Aminosäuren des Na⁺/Phosphat Kotransporters vorhanden (T-R-L-COOH). Die Interaktion dieser Domäne mit dem NaPi-IIa C-Terminus wurde *in vitro* durch einen "Blot-Overlay" mit aufgereinigten Fusionsproteinen bestätigt. Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, wurde der komplette Klon isoliert. Dieser umfaßt 4.3 kb und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 77 kD. Zur immunhistochemischen Lokalisation von C160 wurden Nierenzellkulturen (OK-Zellen) untersucht, welche C160 und NaPi-IIa überexprimieren. Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern konnten beide Proteine in der Bürstensaummembran dieser Zellen kolokalisiert werden. C160 gehört zu der Adapter-Proteinfamilie Shank. Zwei Isoformen dieser Proteinfamilie wurden untersucht: Shank 2 und das im Lauf der Arbeit klonierte und in Shank3b umbenannte C160. Im intakten Organ ist eine Wechselwirkung von Shank3b/C160 mit NaPi-IIa unwahrscheinlich. Shank3b/C160 ist nach immunhistochemischen Untersuchungen an Mäusenierenschnitten in einem anderen Zelltyp als NaPi-IIa exprimiert. Shank3b/C160 wurde ausschließlich in dendritischen Zellen und Lymphocyten detektiert, auch in Rattenniere, Rattenleber und Rattenthymus.

Da die Isoform Shank2 ein vielversprechender Kandidat für eine physiologisch relevante Interaktion mit NaPi-IIa ist, wurde dieses Protein immunhistochemisch in der Mäuseniere lokalisiert. Hierdurch konnte klar gezeigt werden, daß Shank2 und NaPi-IIa in der Bürstensaummembran von proximalen Tubuluszellen der Niere kolokalisiert sind. Durch Western-Blots mit der Bürstensaummembranfraktion der Mäuseniere wurde dieser Befund bestätigt. Für eine funktionelle Einordnung von Shank2 in das komplexe Netzwerk von Interaktionen in der Regulation von NaPi-IIa sind jedoch zu wenig Informationen vorhanden. Eine Interaktion der beiden Proteine ist sehr wahrscheinlich, obwohl sie *in vivo* noch nicht auf molekularer Ebene bewiesen wurde. Beide Proteine werden jedoch zur luminalen Membran von proximalen Tubuluszellen sortiert. Zur Beschreibung der dynamischen Vorgänge in der spezifischen

Regulation von NaPi-IIa sind jedoch sicherlich weitere Interaktionspartner nötig, welche noch identifiziert werden müssen.

7 ANHANG

7.1 Konstruktion von Plasmiden

7.1.1 pCMLexA und pCZFLexA

Zur Konstruktion des Plasmids pCMLexA wurde der C-Terminus von NaPi-IIa der Maus mit den Primern M-EcoRI und M-SalI aus einer klonierten cDNA des Transporters aus der Mäuseniere mittels PCR amplifiziert. Analog erfolgte die Amplifizierung des entsprechenden Klons aus dem Zebrafisch mit den Primern ZF-EcoRI und ZF-SalI zur Konstruktion des Plasmids pCZFLexA. Die gebildeten DNA-Fragmente wurden mit den Endonukleasen *EcoRI* und *SalI*, welche von den Primern in die kodierende Sequenz eingefügt wurden, geschnitten. Diese Fragmente konnten hiernach gerichtet in den mit den entsprechenden Enzymen geschnittenen Vektor pBTM116 kloniert werden. Die Primer wurden so konzipiert, daß sie eine Klonierung in den offenen Leserahmen von der DNA-bindenden LexA Domäne ermöglichen. Die Klone wurden durch PCR aus Bakterienzellen auf erfolgreiche Ligation des Inserts untersucht. Die Sequenz wurde durch nicht-radioaktive Sequenzierung bestätigt.

7.1.2 pCMGEX

Mit Hilfe der Primer M-BamHI und M-SalI wurde ein Fragment des Na⁺/Phosphat Kotransporters der Maus mittels PCR amplifiziert, welches analog zu dem Plasmid für den Two-Hybrid Screen die letzten C-terminalen 72 Aminosäuren umfaßt. Im Gegensatz zu dem Fragment für den Two-Hybrid Screen besitzt dieses PCR-Produkt eine *BamHI*-Schnittstelle. Diese Schnittstelle wurde auf den offenen Leserahmen des C-Terminus des Na⁺/Phosphat Kotransporters und des Glutathion-S-Transferasegens auf dem bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T3 abgestimmt. Durch die Klonierung dieses Fragments über die entsprechenden Restriktionsstellen für *BamHI* und *SalI* wurde der Expressionsvektor pCMGEX zur Produktion von GST-NaPi-IIa-[C-term] erhalten.

7.1.3 p160MBP

Zur Konstruktion von pCMGEX wurde der komplette Bereich von C160 mittels PCR amplifiziert, welcher in dem Two-Hybrid Screen identifiziert wurde. Dieser Bereich umfaßt außer der PDZ-Domäne noch einen kleinen Teil einer SH3-Domäne. Zur Amplifizierung wurden die Primer 160a und 160b verwendet, welche analog zu den Primers M-BamHI und M-SalI Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI bzw. *Sal*I besitzen. Die Schnittstellen wurden auf den offenen Leserahmen der PDZ-Domäne und des Gens für das Maltose bindende Protein auf dem bakteriellen Expressionsvektor pMal/Thrombin abgestimmt. Durch diese Klonierung wurde der Vektor p160MBP zur Expression des Fusionsproteins MBP-C160-[PDZ] erhalten.

7.2 Sequenzierung von C160/Shank3b

7.3 Verwendete Oligonukleotide

7.3.1 Standardprimer

Name	Sequenz	T _m
M13 universal	GTAAAACGACGGCCAGT	45.2
malE	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC	60.8
pGEX-4T3 up	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	67.9
pGEX-4T3 down	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	64.6
VP16	GAGTTTGAGCAGATGTTTAC	41.1

7.3.2 Klonierung von pCMLexA, pZFLexA, pCMGEX und p160MBP

Name	Sequenz	T _m
M-Sall	CATGCGGTTCGACTTAGAGACGGGTGGCATTGTGGT	76.6
M-EcoRI	ACAGAATTCCGAAGTCCCGGGCACCTC	69.0
M-BamHI	ACAGGATCCCGAAGTCCCGGGCACCTC	72.1
ZF-Sall	CATGCGGTTCGACTTATAAAGATGTTGCCTTCAGGATTTTCGC	75.5
ZF-EcoRI	GTGACAGAATTCCACAAACCTCAATGGCTTCCTTCT	70.3
160a	CGCGTGGATCCCCGAATTCCTCACCGTGAAGGGCCGA	85.5
160b	CGGCCGCTCGAGTCGACCCTCATGGGCTCTGCGCCGAGCA	89.4

7.3.3 Gewebeverteilung und Screening der Bibliothek

Name	Sequenz	T _m
MTC160nor	GGGCCGAACAGGCTGGTTCCCAGC	70.5
MTC160rev	AACCTTCATGACCAGGCGGTTGCCACC	70.4
MTC-NaPi-7-nor	TACTGTGGTACCCGCTGCCCTGCACACG	71.9
MTC-NaPi-7-rev	TTCCAGGCAGTAGTCGGGGCCTGTAGCC	70.4

7.3.4 5'-RACE

Name	Sequenz	T _m
c160-5'-RACE	GGGCTGATCTTGTGTGG	48.0
c160-5'-LIB-nestedII	CCTGCTGAGGGCCGCTGATGTCATTC	71.2
c160-5'-RACE-PstI	ATTCTGCAGTTCACCATCCCTGTC	59.0
c160-ANKII	GGTCGTCAATGCCCTGCGTTCCG	70.4

7.3.5 Konstruktion von pC160

Name	Sequenz	T _m
5'-full-EcoRI	CGGAATTCTGGCTGTGCGGGAGTGACT	71.3

7.3.6 Degenerierte Suchprimer

Name	Sequenz	T _m
nor-160s	GTGAAGGGCCG A/C AC A/G GGCTGGTT C/T CC	ca. 65.0
rev-160s	CTTCATGAC C/G AGGCGGTTGCCACC C/T TG	ca. 70.5

7.3.7 Sequenzierung von pC160 und pC160-3'

Name	Sequenz	T _m
Sinnstrang:		
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	36.2
c160-full-I	GCATTGACGACCCTGCTG	51.9
MTC 160 nor	GGGCCGAACAGGCTGGTTCCCAGC	70.5
c160-5'	AGAACCACGCTGACCCTGC	58.3
c160full-IV	CCCTGCCGCTGAACCC	54.3
c160full-VI	CCCAATTCCCTGCCCTGT	50.1
c160-3'-II	CCTGTGCAAGCTTCTGC	58.8
Gegensinnstrang:		
M13 nor	GTAAAACGACGGCCAGT	45.2
c160-3'	CTAAGGAATGGGGCCGATGG	57.9
c160 Seq-III	CCACCCATCCAGAACAGCC	54.9
c160 Seq-IV	GAGTCACCAAGGCGTGTC	52.5
c160 Seq-V	CGAACTTGCTCCAGAGCTG	50.8
MTC 160-rev	AACCTTCATGACCAGGCGGTTGCCACC	70.4
MTC 160 nor-inv	GCTGGGAACCAGCCTGTTCCGCCC	70.5
5'-RACE	GGGCTGATCTTGTTGTGG	48.0
c160full-Irev	GTCCAAAGCGACAGGCC	50.9

7.4 Sequenzen

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Translate (Expasy) übersetzt. Nichtkodierende Sequenzen sind kursiv dargestellt.

7.4.1 Sequenz von Shank3b/C160 der Maus

Die komplette Sequenz von C160/Shank3b wurde mit Hilfe der "primer-walking"-Methode erhalten. Beide Stränge wurden sequenziert.

Sequenzierung des Sinnstrangs

Der 5'-Bereich des Plasmids pC160-3' wurde mit den Primern M13-rev, MTC 160 nor und c160-5' sequenziert. Im 3'-Bereich dieses Plasmids wurde der Primer c160-3'-II verwendet. Die fehlenden Bereiche wurden auf dem Plasmid pC160 sequenziert. Hierzu wurden die Primer M13rev, c160full-I, c160full-II, c160-hairpin, c160full-IV und c160full-IV verwendet. Die Sequenzierung mit dem Primer c160full-II gelang nur nach Zugabe von 5% DMSO, da die Sequenz in diesem Bereich sehr GC-reich ist und zusätzlich ein großes Palindrom aufweist. Solche Sequenzen neigen dazu, Haarnadelstrukturen zu bilden, welche die Sequenzierung erschweren. Auf dem Sinnstrang ist die Sequenz deshalb auf einem Bereich von ca. 50bp nicht eindeutig. Die Sequenz auf dem Gegenstrang ist jedoch eindeutig und von hoher Qualität. Die fraglichen Sequenzen befinden sich jedoch im nichttranslatierten Bereich des Klons.

Sequenzierung des Gegenstrangs

Das Plasmid pC160-3' wurde mit den Primern M13 nor, c160-3' c160 Seq-III c160 Seq-IV und MTC 160-rev sequenziert. Die fehlenden Bereiche wurden auf dem Plasmid pC160 mit den Primern c160 Seq-V, MTC 160 nor-inv, 5'-RACE, und c160full-Irev ermittelt.

C160/Shank3b

tggtgtgctgctgacactgtgggcaggagggaggcaagcagcccaggtggtagcca 60
W L C G S D T V G R R E A S S P R W - P
Cctcttgctcacatgggcctgtgtggtagtccttctccccaccttttctttatctgagcag 121
P L A H M G L C G S L L P T F S L S E Q
Ttccgataacaagcggagagtttatgccagaacctcatagatgacaagcagtttgcaaag 180
F R Y K R R V Y A Q N L I D D K Q F A K
Ctacacacaaaggcaaacctgaagaagttcatggactatgtccagctacacagcacagat 240
L H T K A N L K K F M D Y V Q L H S T D
Aaggtggccccgcctgctggacaaggggctggaccccaatttccatgacctgactcagga 300
K V A R L L D K G L D P N F H D P D S G
Gagtgcctctgagccttgccggcacagttggacaacgccactgacctcctgaaggttctc 360
E C P L S L A A Q L D N A T D L L K V L
Cgcaacggcgggtgctcatctggacttccggacccgagatgggctgacagccgtccactgt 420
R N G G A H L D F R T R D G L T A V H C
Gctaccgccagcggaaacgcaggggcattgacgacctgctggacctgggggcttgcct 480
A T R Q R N A G A L T T L L D L G A S P
Gactacaaggacagccgcggcctgacgccccctgtaccatagtgccctagggggcggggat 540
D Y K D S R G L T P L Y H S A L G G G D
Gccctctggtgagctgcttctccatgatcatgcacagctggggaccactgatgagaat 600
A L C C E L L L H D H A Q L G T T D E N
Ggttggcaagagatccatcaggcctgtcgctttggacacgtgcagcacctggagcacctt 660
G W Q E I H Q A C R F G H V Q H L E H L
Ttgttctatggggccaacatgggtgctcagaatgcctcgggaaacacagccctgcacatc 720
L F Y G A N M G A Q N A S G N T A L H I
Tgtgccctctacaaccaggagagctgcgcgcgcgtcctgcttttccgtggtgccaacaag 780
C A L Y N Q E S C A R V L L F R G A N K
Gacgtccgcaattacaacagccagacagccttccaggtggccattattgcaggggaacttt 840
D V R N Y N S Q T A F Q V A I I A G N F
Gagcttgccgaggtaatcaagaccacaaagactccgatgtcgtaccattcagggaaacc 900
E L A E V I K T H K D S D V V P F R E T
Cccagctatgcaaagcgacggcgtctggctggccccgagtggcctggcatccccacggccc 960
P S Y A K R R R L A G P S G L A S P R P
Ttacagcgtcagccagtgatatcaacctgaaaggtgatcagcccgcagcttctccaggg 1020
L Q R S A S D I N L K G D Q P A A S P G
Cccactctccgaagcctccctcatcaactcttgctccagaggcttcaggaggagaaagac 1080
P T L R S L P H Q L L L Q R L Q E E K D
Cgtgacagggatggtgaactggagaatgacatcagcggccctcagcagggcaggggtggc 1140

R D R D G E L E N D I S G P S A G R G G
Cacaacaagatcagccccagtgggcccgccgcatccggccccgcgcccggccccggccccg 1200
H N K I S P S G P G G S G P A P G P G P
Gcgtctccccgcgccccccgcgcccgcgccccggggccccgaagcggaaactttacagtgcc 1260
A S P A P P A P P P R G P K R K L Y S A
Gtccccggccgcaagttcatcgctgtgaaggcgcacagcccgcagggcgagggcgagatc 1320
V P G R K F I A V K A H S P Q G E G E I
Ccgctgcaccgcggcgaggccgtgaaggtgctcagcattggggagggcggtttctgggag 1380
P L H R G E A V K V L S I G E G G F W E
Ggaaccgtgaagggccgaacaggctggttcccagctgactgtgtggaagaagtgcagatg 1440
G T V K G R T G W F P A D C V E E V Q M
Cgacagtatgacaccggcatgaaaccagagaggaccggacgaagcgtctcttccgccac 1500
R Q Y D T R H E T R E D R T K R L F R H
Tacactgtgggttccctatgacagcctcacttcacacagcgattatgtcatcgatgataag 1560
Y T V G S Y D S L T S H S D Y V I D D K
Gtggctatcctgcagaaaagggacatgaggggtttggctttgttctccggggagccaaa 1620
V A I L Q K R D H E G F G F V L R G A K
Gcagagacccccattgaggagtttacaccacacctgccttccctgcactccaatacctt 1680
A E T P I E E F T P T P A F P A L Q Y L
Gagtctgtagatgtggaaggtgtggcctggagggctggacttccaactggggacttctc 1740
E S V D V E G V A W R A G L R T G D F L
Attgaggtgaacggagtgatgtcgtgaaggttgacacaagcaagtgggtgggtctcatc 1800
I E V N G V N V V K V G H K Q V V G L I
Cgtcaggggtggcaaccgcctgggtcatgaaggttgtgtctgtgaccaggaaaccggaggag 1860
R Q G G N R L V M K V V S V T R K P E E
Gatgggtgctcggcgagagccccaccacccccaaagaggggtcccagcaccacgctgacc 1920
D G A R R R A P P P P K R A P S T T L T
Ctgcgggtccaagtccatgacggctgagctcgaggaacttgagaagttggatgagatcctg 1980
L R S K S M T A E L E E L E K L D E I L
Gcagttgccgaggagccgacactgaggccggacattgcagatgctgactcgagggcgggcc 2040
A V A A E P T L R P D I A D A D S R A A
Actgtcaagcagcggcccaccagccggaggatcaccctgctgagatcagctcattgttt 2100
T V K Q R P T S R R I T P A E I S S L F
Gagcgcagggcctcccaggcccagagaagctgccgggctctctgcggaaggggattcca 2160
E R Q G L P G P E K L P G S L R K G I P
Cggaccaaactgttaggtcttccagcagcctcgggtgagct**tgagcaccatctcagcgcagc** 2220
R T K S V G S S A A S V S -
Gcagcccggggggcccgggcgaggggcctcctactcgggtgcccagcggccgggtacc 2280
Ccggtggcgagacgagccccgagcccagtgaaaccgcacatcgctggagcgggtggaggggc 2340
Tgggggcgggcgtgggaggcgcggggcgcccttcggcctcacgcctcccaccatcctca 2400
Agtcgtccagcctctccatcccgcacgaaccaaggaagtgccgttcgtgggtgcaagtg 2460

<i>Tgagtgcgcgcagccgctccccctcaccatctccgctgccctcgcttctcccggctctg</i>	2520
<i>Gccccagtgccggccccgcgctcgccatttcaacagaagccccctgcagctctggagcaagt</i>	2580
<i>Tcgatgtgggcgactggctggagagcatccacttaggcgagcaccgagaccgcttcgagg</i>	2640
<i>Accatgagatcgaaggcgcacacctgcctgcgctcaccaaggaagacttcgtggagctgg</i>	2700
<i>Gcgtcacacgcgcttgccaccgcatgaacatcgagcgtgcgctcaggcagctggatggca</i>	2760
<i>Gctgacgccccactccctctcctgttccctgctgcgccctgccggcagggccccccaccct</i>	2820
<i>Actccaggccgcaggctcggctcgccccctaccacggcgcggggccaggaatgttgcac</i>	2880
<i>Gaatcgtcctgtttctgctgttctggagacttgccctgtacattgcttagtgccctcccc</i>	2940
<i>Tgccgctgaacccccaccagcacacagtaagggcgcggaaccgggggggctgggtggaagg</i>	3000
<i>Ggggtggggcaggggtgctctggcctgaccacttccctccatagctcctgggtggccattctt</i>	3060
<i>Ccagagggggaacctagtcagcatgcgaggtcaggacacgccttgggtgactcgggggga</i>	3120
<i>Ggggggagacattggggttctcगतatagggggccaaggagccccctgttttacatattttaa</i>	3180
<i>Tccactctatatttgaaagagaaaaggaacaaatatctctgtccgtaaatagttcccgcc</i>	3240
<i>Ctcttcccctctagtctctcgctgggtcccgccacagctgccagctcttccatctctggc</i>	3300
<i>Ccctcactgccaccccatacagggcaggggacactccagctggcctgggggttagccaggg</i>	3360
<i>Tcctggcagcccaccctggggacccccggctcagcccccttccctcgctgagctatagta</i>	3420
<i>Tgccccaccacccttttaggtgctgctcagggggacgggtggcagggcattgcctgctggg</i>	3480
<i>Cactagcagggccaggtggcctgggaaattattgccctggggctgggccccggtaaccca</i>	3540
<i>Aaccccagccatcatcttcacagggctctctcccacaggaggggtctaacctttcccactt</i>	3600
<i>Cttgggcaactacagcagagaagcctccctgcctcgcacccccaaagactccccaatcct</i>	3660
<i>Gccctgtgtgtgtgtgtgcgccacataatgtgtgtgcacgcctgtgtgcttgtgaaaact</i>	3720
<i>Ggggtgtggctgagcgcctgggtgccctgtgtgtgcttgactgtgcagtggtccccagggg</i>	3780
<i>Ctgttctggatgggtgggaggtggcggcagaagcttgcacaggggtgcatgcatgggtgtg</i>	3840
<i>Tgccccgggaaggggcccctgtcctgctgggtgggtcctgctgttctctcagcctgtcccctc</i>	3900
<i>Ctccccaaacctcaccagcttaagcagggattcttctgtaatcctttcagcttcggggag</i>	3960
<i>Gcctcaagggctccccccgcagggcagtagcccttcgggcttctaaggggaattgtggggac</i>	4020
<i>Cactaaaatcaggccacaacagcccttgagagagggcaagactcctgaggggtcccctgg</i>	4080
<i>Ccccccttactgtgactcctcacactcagcaatgacctgtgggggtggggggccctggggca</i>	4140
<i>Tttttaaacatcgggtttggagtctggactaagctccatccacgtcactcacaagtttct</i>	4200
<i>Gtttctatcttagcttttttaataaaaaataaataaataaataaataaataaataaataa</i>	4260
<i>Atatataatataaaaagacagaaaacaggtgttttcatggcccaggggcttggcacgccg</i>	4320
<i>Gtctgtgcccacctgccccaccctggcccatcgggccccattccttagacacagagtcaca</i>	4380
<i>Cccactaacctctcaccaacagagcaggtcacacacacagcagcagtcactgtaacaga</i>	4440
<i>Ctgccacatacacagtctcacatttacctgtgggtttttgggttctgttcaatttgggttt</i>	4500
<i>Ttaactttacagggtcagttccgcttctcccccccccccttttgtatggagttccatctg</i>	4560
<i>Gggggctttcaacccccctgctccagtcctgaggcctcctgaccctgacgttgtgatacac</i>	4620
<i>Cccacagagatctatgtttcttatattattattattaataataaattattataatattatg</i>	4680
<i>Taataaatttataagaaatga</i>	4701

7.4.2 Vorgeschlagene Sequenz für Shank3b/C160 aus dem Menschen

Durch Homologiesuchen mit dem Programm BLAST (Washington University) wurden zwei Cosmidklone vom menschlichen Chromosom 22 (Abschnitt q13) identifiziert, in welchen die genomische Sequenz von Shank3b/C160 enthalten ist. Für die ersten 100 bp und einen kleinen, internen Bereich konnte keine homologe Sequenz gefunden werden. Die Exons des Gens wurden mit Hilfe der Sequenz zu Shank3b der Maus identifiziert und zu einer partiellen Sequenz zusammengefügt. Bezogen auf den Klon n66c4 befindet sich die kodierende Sequenz von Shank3b/C160 auf dem Gegenstrang – bezogen auf den Klon n85a3 auf dem Sinnstrang.

Klon n66c4 (AC000050):

```
...accttttctttatctgagcagtttcgatacaagcggcgagtttat
      T F S L S E Q F R Y K R R V Y
gccagaacctcatcgatgataagcagtttgcaaagcttcacacaaaggcgaacctgaag
  A Q N L I D D K Q F A K L H T K A N L K
aagttcatggactacgtccagctgcatagcacggacaaggtggcacgcctggtggacaag
  K F M D Y V Q L H S T D K V A R L L D K
gggctggaccccaacttccatgaccctgactcaggagagtgccccctgagcctcgcagcc
  G L D P N F H D P D S G E C P L S L A A
cagctggacaacgccacggacctgctaaaggtgctgaagaatggtggtgcccacctggac
  Q L D N A T D L L K V L K N G G A H L D
ttccgcactcgcgatgggctcactgcccgtgactgtgccacacgccagcggaatgcgcca
  F R T R D G L T A V H C A T R Q R N A A
gcactgacggtcagtcaccgacctgctggacctgggggcttcacctgactacaaggacagc
  A L T V S P T L L D L G A S P D Y K D S
cgcggcttgacaccctctaccacagcgcctgggggggtggggatgccctctgctgtgag
  R G L T P L Y H S A L G G G D A L C C E
ctgcttctccacgaccacgctcagctgggatcaccgacgagaatggctggcaggagatc
  L L L H D H A Q L G I T D E N G W Q E I
caccaggcctgccgctttgggcacgtgcagcatctggagcacctgctggttctatggggca
  H Q A C R F G H V Q H L E H L L F Y G A
gacatgggggcccagaacgcctcggggaacacagccctgcacatctgtgccctctacaac
  D M G A Q N A S G N T A L H I C A L Y N
caggagagctgtgctcgtgctcctgctcttccgtggagctaacagggatgtccgcaactac
  Q E S C A R V L L F R G A N R D V R N Y
aacagccagacagccttccaggtggccatcatcgcaggggaactttgagcttgagaggtt
  N S Q T A F Q V A I I A G N F E L A E V
```

atcaagaccacaaagactcggatggtgtaccattcagggaaacccccagctatgccaag
I K T H K D S D V V P F R E T P S Y A K
cggcggcgactggctggccccagtggttggcatccccctcggcctctgcagcgctcagcc
R R R L A G P S G L A S P R P L Q R S A
agcgatatcaacctgaagggggaggcacagccagcagcttctcctggaccctcgctgaga
S D I N L K G E A Q P A A S P G P S L R
agcctccccaccagctgctgctccagcggctgcaagaggagaaagatcgtgaccgggat
S L P H Q L L L Q R L Q E E K D R D R D
gccgaccaggagagcaacatcagtgggccttttagcagggcagggccggccaaagcaagatc
A D Q E S N I S G P L A G R A G Q S K I
Ag... ..agcgg

aaactttacagcgccgtccccggccgcaagttcatcgccgtgaagggcgacagcccgcag
K L Y S A V P G R K F I A V K A H S P Q
ggtgaagggcagatcccgtgcaccgcggcgaggccgtgaaggtgctcagcattggggag
G E G E I P L H R G E A V K V L S I G E
ggcggtttctgggagggaaaccgtgaaagggccgcaggggctggttccccggccgactgctg
G G F W E G T V K G R T G W F P A D C V
gaggaagtgcagatgaggcagcatgacacacggcctgaaacgcgggaggaccggacgaag
E E V Q M R Q H D T R P E T R E D R T K
cggctctttcggcactacacagtgggctcctacgacagcctcacctcacacagcgattat
R L F R H Y T V G S Y D S L T S H S D Y
gtcattgatgacaaagtggctgtcctgcagaaacgggaccacgagggctttggttttgtg
V I D D K V A V L Q K R D H E G F G F V
ctccggggagccaaagcagagacccccatcgaggagttcacgcccacgccagccttccccg
L R G A K A E T P I E E F T P T P A F P
gcgctgcagtatctcgagtcggtggacgtggaggggtgtggcctggagggccgggctgcgc
A L Q Y L E S V D V E G V A W R A G L R
Acgggagacttcctcatcgagg
T G D F L I E

Klon n85a3 (AC000036)

tgaacgggggtgaacgtggtgaaggtcggacacaagcag
V N G V N V V K V G H K Q
gtggtggctctgattcgccaggggtggcaaccgcctcgtcatgaaggttgtgtctgtgaca
V V A L I R Q G G N R L V M K V V S V T
aggaagccagaagaggacggggctcggcgcagagccccaccgcccccaagaggggcccc
R K P E E D G A R R R A P P P P K R A P
agcaccacactgaccctgcgctccaagtccatgacagctgagctcgaggaacttgagaag
S T T L T L R S K S M T A E L E E L E K

ctggacgagatgctggcagccgcccagagccaacgctgcgccagacatcgcagacgca
L D E M L A A A A E P T L R P D I A D A
gactccagagccgcccaccgtcaaacagagggcccaccagtcggaggatcacacccgcccag
D S R A A T V K Q R P T S R R I T P A E
attagctcattgtttgaacgccagggcctcccagggcccagagaagctgccgggctccttg
I S S L F E R Q G L P G P E K L P G S L
cggaaggggattccacggaccaagtctgtaggctcttcagcagcctcgggtgagctgagct
R K G I P R T K S V G S S A A S V S -
ccatttcagcgcagcgcagccccgggggcccggggcggcggggcctcgtactcggtgagggc
ccagtggccgctaccccgtggcgagacgcgccccgagcccgggtgaagcccgcgtcgctgg
agcgggtggaggggctgggggcccggcgccccggggcgcagggcggcccttcggcctcacgc
ccccaccatcctcaagtcgtccagcctctccatcccgcacgagcccaaggaggtgcgct
tcgtggtgcgcagcgtgagcgcgcgcagtcgctccccctcggcgtcggcgtgcccctcgc
ccgcgtccggccccggccccggcgccccggcccacgcccagcccttcacagcagaagccgc
tgcagctctggagcaagttcgacgtggggcactgggtggagagcatccacctaggcgagc
accgcgaccgcttcgaggaccatgagatagaaggcgcgcacctaccgcgcttaccagg
acgacttcgtggagctggggcgtcacgcgcgtggggccaccgcatgaacatcgagcgcgcgc
tcaggcagctggacggcagctgacgccccacccccactcccgccccggcgtgcccctgcc
ggcagggccccccacccccacccccggggcgcgggctcggcctgccccttacgacggcgc
cgggccaaggaatgttgcatgaatcgtcctgtttgctgttgctcgggagactcgccctgtac
attgcttagtgcccctcaccggcccagcccacccagcgcacagtcaggaagggcgtgg
accagggaggctggggcgggaggtgccgggggtgggggtgccctagcgtgaccacctcctt
cgcagctcctggtggccattctcccagagggggaacctagtccagcatgcgaggtcagga
cccgccttggtgactcggggggaggggggagacattgggattctcgatgggggccaagga
gccccctgttttgcatattttaatccactctatatttggaacgagaaaaggaacaaata
tctctgtccgtaatagtttcctctccccctcccttctacttccactggtcccactgcagct
gcccagcttccatctccggcccctcactgccactgccacccccacaacggggcaggggac
gctccagctggtctgggggtggccagggccctagtggcccgcctggggccccagctcgg
cccctcgcctcgtgagctctagtgtgccccaccgacccttcagggtgctgctcgtggtgg
gaggggcggcaggccgcgggtcctgctgtgcacccgcgggaccagccggcctgggagacc
atcggccgggggggatgagggcagggccctgccgctccaccgcagccatcttccctcacag
ggtctctccccaaggagggggctagcttggtccccatgctcttgggcaactacagcagag
aagcctccctgccttggaacccaaagtctcctgtcctgcctttatgtgtgtgggtgaaa
ctgggtgctctgagcacgtgggagccgtgtgtgtgcctgattactgagtgggcaccagg
ggccgctctggactagcgcggggcctggaggcgtgcaccgtgtgcatgcgtgggggtga
cctgtgagagcaccctgtctcctcttccaaagaaagtcagagggccatcctgcaccctggg
tccagctgtttgcccagcctgtccttccagagcctcaccagcctgagcgggggttccctg
gtgaatccctgctgcttggggaggccccaagggccccttggaggcagcggccccaccttg
ggcttctgagggcatcatagggggacccttagagtcagttcaccacaggccctgggggaga
gtcaaagacccccgaggggtgccagccccccacactgtgactcctcacactcagcgatga

cctgtggggtggggggccctgggacgtttttaaacctagggtttggagtctggactaagc
tccatccacgtcactcacaagtttctgtttatatttctagcttttttaataaaaataaaa
aaaaaaagaaaacagaagttttcacaaccaggggctggcacgccggtctgtgcctgcc
cgccccgccctggcccaccggccccactccctgggcacagagtcacaccaactcatcctt
ccgccaacagtccaggtcacacagcagcagtcactgtaacagactgccacatacacactc
ggtctcacactcacctgtggggttttggttccgttcaatttggggttttaactttacaggg
tcagttccgcttcacctccttttgtatggagtccatccgggggggtttcaccccctgctc
cagtcctgaggcctcctgaccctgacgttgtgatacggcccacagagatctatgtttott
atattattattattgataataattattataatattattatgtaataaatttataagaat
gaa

Vergleich mit der Sequenz der Maus

hc160 ---XXXXTFSLSSEQFRYKRRVYAQNLIIDDKQFAKLHTKANLKKFMDYVQLHSTDKVAR 56
c160 MGLCGSLLPFSLSEQFRYKRRVYAQNLIIDDKQFAKLHTKANLKKFMDYVQLHSTDKVAR 60

hc160 LLDKGLDPNFHDPDSGECPLSLAAQLDNATDLLKVLKNGGAHLDFRTRDGLTAVHCATRQ 116
c160 LLDKGLDPNFHDPDSGECPLSLAAQLDNATDLLKVLKNGGAHLDFRTRDGLTAVHCATRQ 120
*****:*****

hc160 RNAAALTVSPTLLDLGASPDYKDSRGLTPLYHSALGGDALCCELLLHDHAQLGITDENG 176
c160 RNAGALTT--LLDLGASPDYKDSRGLTPLYHSALGGDALCCELLLHDHAQLGITDENG 177
..*****

hc160 WQEIHQACRFQVHLEHLLFYGADMGAQNASGNTALHICALYNQESCARVLLFRGANRD 236
c160 WQEIHQACRFQVHLEHLLFYGANMGAQNASGNTALHICALYNQESCARVLLFRGANKD 237
*****:*****:

hc160 VRNYNSQTAFQVAIIAGNFELAEVIKTHKDSDVVPFRETSPYAKRRRLAGPSGLASPRPL 296
c160 VRNYNSQTAFQVAIIAGNFELAEVIKTHKDSDVVPFRETSPYAKRRRLAGPSGLASPRPL 297

hc160 QRSASDINLKGEAQPAASPGPSLRSLPHQLLLQRLQEEKDRDRDADQESNISGPLAGRAG 356
c160 QRSASDINLK-GDQPAASPGPTLRSLPHQLLLQRLQEEKDRDRDGELENDISGPSAGRGG 356
***** *****:*****.:*.:**** **.*

hc160 QSKIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKLYSAVPGRKFIIVKAHSPQGEGEI 405
c160 HNKISPSGGSGPAPGPGPASPAPPAPPGRKLYSAVPGRKFIIVKAHSPQGEGEI 416
:.* *****

hc160 PLHRGEAVKVLISIGEGFWEGTVKGRGWFPADCVVEVQMRQHDTRPETREDRTKRLFRH 465
c160 PLHRGEAVKVLISIGEGFWEGTVKGRGWFPADCVVEVQMRQYDTRHETREDRTKRLFRH 476
*****:*** *****

hc160 YTVGSYDSLTSYSDYVIDDKVAVLQKRDHEGFGFVLRGAKAETPIEEFTPTPAFPALQYL 525
c160 YTVGSYDSLTSYSDYVIDDKVAIVLQKRDHEGFGFVLRGAKAETPIEEFTPTPAFPALQYL 536
*****:*****

hc160 ESVDVEGVAWRAGLRTGDFLIEVNGVNVVKVGHKQVVALIRQGGNRLVMKVVSVTRKPEE 585
c160 ESVDVEGVAWRAGLRTGDFLIEVNGVNVVKVGHKQVVGGLIRQGGNRLVMKVVSVTRKPEE 596
*****.*****

hc160 DGARRRAPPKRAPSTTLTLRSKSMATAELELEKLEDEMLAAAAEPTLRPDIADADSRRA 645
c160 DGARRRAPPKRAPSTTLTLRSKSMATAELELEKLEDEILAVAAEPTLRPDIADADSRRA 656
*****:*.*****

hc160 TVKQRPTSRRITPAEISSLFERQGLPGPEKLPGLSLRKGIPRTKSVGSSAASVS 698
c160 TVKQRPTSRRITPAEISSLFERQGLPGPEKLPGLSLRKGIPRTKSVGSSAASVS 709

7.4.3 Sequenz von NG22H

Dieser Klon zeigt eine deutliche Interaktion mit NaPi-IIa im Two-Hybrid System. Zur Zeit der Klonierung war jedoch noch keine Information zu diesem Klon verfügbar. Neue Datenbanksuchen zeigen, daß es sich bei diesem Protein um ein Homolog von NG22 handelt. Anhand der Sequenz können jedoch keine Rückschlüsse auf die Funktion dieses Proteins geschlossen werden. Möglicherweise handelt es sich jedoch um ein Pseudogen (siehe Genbank Accession Nr. AAC84166).

```
gagtacggtgggatcgattggatccccgggtaccgagctcaattgcccgcgtcactccg
E Y G G I D W I P G Y R A Q L R P L T P
acgtctccctggtggaccacctcaactcgccatgcagatatttgaagattacactgtatcc
T S P W W T P Q L A M Q I F E D Y T V S
tggactggattatcataggtctggctcattgccatggtgctgagctcctggtcatcgtc
W Y W I I I G L V I A M V L S L L F I V
ctgctgcgattcctggctggcattatggtctgggtgatgattgtcatggtgatcctggtg
L L R F L A G I M V W V M I V M V I L V
cttggtatggcatcttccactgctacatggagtactcgagactccgtggagagggcaggc
L G Y G I F H C Y M E Y S R L R G E A G
tccgacgtctccctggtggaccctgagcggcgcgtagatagatagaagctcgaattcact
S D V S L V D P E R P L D R - K L E F T
```

Sequenzvergleich mit NG22

SWALL:Q9Y332 Q9Y332 NG22 (human)

Length = 712

Score = 207 (77.9 bits), Expect = 1.2e-15, P = 1.2e-15

Identities = 39/76 (51%), Positives = 60/76 (78%)

Query: 11 LAMQIFEDYTVSWYWIIGLVIAMVLSLLFIVLLRFLAGIMVWVMIVMVLVLYGIFHC 70

++++IFED+ SWYWI++ L +A+VLSLLFI+LLR +AG +V V+I+ V+ VL YGI++C

Sbjct: 217 ISVKIFEDFAQSWYWILVALGVALVLSLLFILLRLLVAGPLVVLVILGVLGVLAYGIYYC 276

Query: 71 YMEYSRLRGEAGSDVS 86

+ EY LR + G+ +S

Sbjct: 277 WEEYRVLRL-DKGASIS 291

8 Literatur

Adey, N.B., Huang, L., Ormonde, P.A., Baumgard, M.L., Pero, R., Byreddy, D.V., Tavtigian, S.V., Bartel, P.L. Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res* **60**(1):35-7 (2000)

Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Huganir, R.L., Worley, P.F. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**(6622):284-8 (1997)

Boeckers, T.M., Winter, C., Smalla, K.H., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(1):247-52 (1999)

Booth, A.G. and Kenny, A.J. A Rapid Method for the Preparation of Microvilli from Rabbit Kidney. *Biochem J* **142**:575-581 (1974)

Cao, T.T., Deacon, H.W., Reczek, D., Bretscher, A., von Zastrow, M. A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **401**(6750):286-90 (1999)

Deen, P.M., Knoers, N.V. Physiology and pathophysiology of the aquaporin-2 water channel. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**(1):37-42 (1998)

Elliott, D.E., Li, J., Blum, A.M., Metwali, A., Patel, Y.C., Weinstock, J.V. SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur J Immunol* **29**(8):2454-63. (1999)

Evers, C., Murer, H., Kinne, R. Effect of parathyrin on the transport properties of isolated renal brush-border vesicles. *Biochem J* **172**(1):49-56 (1978)

Fiedler, M.A., Nemezc, Z.K. and Shull, G.E. Cloning and sequence analysis of rat cystic fibrosis transmembrane conductance regulator *Am J Physiol* **262**(6):779-784 (1992)

Forster, I.C., Traebert, M., Jankowski, M., Stange, G., Biber, J., Murer, H. Protein kinase C activators induce membrane retrieval of type II Na⁺-phosphate cotransporters expressed in *Xenopus oocytes*. *J Physiol* **517**(Pt 2):327-40 (1999)

Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S., Lefkowitz, R.J. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* **392**(6676):626-30 (1998)

Hansch, E., Forgo, J., Murer, H., Biber, J. Role of microtubules in the adaptive response to low phosphate of Na/Pi cotransport in opossum kidney cells. *Pflugers Arch* **422**(5):516-22 (1993)

Hartmann, C.M., Wagner, C.A., Busch, A.E., Markovich, D., Biber, J., Lang, F. and Murer, H. Transport characteristics of a murine renal Na/Pi-cotransporter *Pflugers Arch* **430**(5):830-836 (1995)

Hattenhauer, O., Traebert, M., Murer, H., Biber, J. Regulation of small intestinal Na-P(i) type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1):G756-62 (1999)

Hilfiker, H., Hattenhauer, O., Traebert, M., Forster, I., Murer, H. and Biber, J. Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine *Proc Natl Acad Sci* **95**(24):14564-14569 (1998)

Koenig, J.A., Kaur, R., Dodgeon, I., Edwardson, J.M., Humphrey, P.P.A. Fates of endocytosed somatostatin sst2 receptors and associated agonists. *Biochem J* **336**(Pt 2):291-8 (1998)

Kohl, B., Herter, P., Hulseweh, B., Elger, M., Hentschel, H., Kinne, R.K., Werner, A. Na-Pi cotransport in flounder: same transport system in kidney and intestine. *Am J Physiol* **270**(6 Pt 2):F937-44 (1996)

Kohl, B., Wagner, C.A., Hulseweh, B., Busch, A.E., Werner, A. The Na⁺-phosphate cotransport system (NaPi-II) with a cleaved protein backbone: implications on function and membrane insertion. *J Physiol* **508**(Pt 2):341-50 (1998)

Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J.I., Suh, P.G., Sheng, M., Kim, E. Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J Biol Chem* **274**(41):29510-8 (1999)

Lin, J.-T., Kormanec, J., Wehner, F., Wielert-Badt, S., and Kinne, R.K.H.: High-level expression of Na⁺/ D-glucose cotransporter (SGLT1) in a stably transfected Chinese hamster ovary cell line. *BBA* **1373**:309-320 (1998)

Linari, M., Ueffing, M., Manson, F., Wright, A., Meitinger, T., Becker, J. The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci* **96**(4):1315-20 (1999)

Loetscher, M., Scarpetta, Y., Levi, M., Halaihel, N., Wang, H., Zajicek, H.K., Biber, J., Murer, H., Kaissling, B. Rapid downregulation of rat renal Na/P(i) cotransporter in response to parathyroid hormone involves microtubule rearrangement. *J Clin Invest* **104**(4):483-94 (1999)

Malmstrom, K., Murer, H. Parathyroid hormone regulates phosphate transport in OK cells via an irreversible inactivation of a membrane protein. *FEBS Lett* **216**(2):257-60 (1987)

Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J., Murer, H. Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc Natl Acad Sci* **90**(13):5979-83 (1993)

Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S., Takai, Y. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J Cell Biol* **139**(2):517-28 (1997)

Minkoff, C., Shenolikar, S., Weinman, E.J. Assembly of signaling complexes by the sodium-hydrogen exchanger regulatory factor family of PDZ-containing proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **8**(5):603-8 (1999)

Moyer, B.D., Denton, J., Karlson, K.H., Reynolds, D., Wang, S., Mickle, J.E., Milewski, M., Cutting, G.R., Guggino, W.B., Li, M., Stanton, B.A. A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* **104**(10):1353-1361 (1999)

Munroe, D.J., Loebbert, R., Bric, E., Whitton, T., Prawitt, D., Vu, D., Buckler, A., Winterpacht, A., Zabel, B., Housman, D.E. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR. *Proc Natl Acad Sci* **92**(6):2209-13 (1995)

Nalbant, P., Boehmer, C., Dehmelt, L., Wehner, F., Werner, A. Functional characterization of a Na⁺-phosphate cotransporter (NaPi-II) from zebrafish and identification of related transcripts. *J Physiol* **520**(Pt 1):79-89 (1999)

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., Sheng, M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* **23**(3):569-82 (1999)

Paquin, J., Vincent, E., Dugre, A., Xiao, Y., Boyer, C.J., Beliveau, R. Membrane topography of the renal phosphate carrier NaPi-2: limited proteolysis studies. *Biochim Biophys Acta* **1431**(2):315-28 (1999)

Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J., Okada, S. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem* **274**(5):2593-6 (1999)

Pfister, M.F., Hilfiker, H., Forgo, J., Lederer, E., Biber, J., Murer, H. Cellular mechanisms involved in the acute adaptation of OK cell Na/Pi-cotransport to high- or low-Pi medium. *Pflugers Arch* **435**(5):713-9 (1998)

Pfister, M.F., Lederer, E., Forgo, J., Ziegler, U., Lotscher, M., Quabius, E.S., Biber, J., Murer, H. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem* **272**(32):20125-30 (1997)

Pfister, M.F., Ruf, I., Stange, G., Ziegler, U., Lederer, E., Biber, J., Murer, H. Parathyroid hormone leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter. *Proc Natl Acad Sci* **95**(4):1909-14 (1998)

Reczek, D., Berryman, M., Bretscher, A. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* **139**(1):169-79 (1997)

Roche, K.W., Tu, J.C., Petralia, R.S., Xiao, B., Wenthold, R.J., Worley, P.F. Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **274**(36):25953-7 (1999)

Schagger, H. von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**(2):368-379 (1987)

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., Cantley, L.C. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**(5296):73-7 (1997)

Sorribas, V., Markovich, D., Hayes, G., Stange, G., Forgo, J., Biber, J., Murer, H. Cloning of a Na/Pi cotransporter from opossum kidney cells. *J Biol Chem* **269**(9):6615-21 (1994)

Stoll, R., Kinne, R., Murer, H. Effect of dietary phosphate intake on phosphate transport by isolated rat renal brush-border vesicles. *Biochem J* **180**(3):465-70 (1979)

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** 4350 (1979)

Traebert, M., Hattenhauer, O., Murer, H., Kaissling, B., Biber, J. Expression of type II Na-P(i) cotransporter in alveolar type II cells. *Am J Physiol* **277**(5 Pt 1):L868-73 (1999)

Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., Worley, P.F. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **23**(3):583-92 (1999)

Verri, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J., Murer, H. Cloning of a rabbit renal Na-Pi cotransporter, which is regulated by dietary phosphate. *Am J Physiol* **268**(4 Pt 2):F626-33 (1995)

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., Cooper, J.A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**(1):205-14 (1993)

Werner, A., Dehmelt, L., Nalbant, P. Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *J Exp Biol* **201**(Pt 23):3135-42 (1998)

Werner, A., Murer, H. and Kinne, R.K. Cloning and expression of a renal Na-Pi cotransport system from flounder *Am J Physiol* **267**(2 Pt 2):F311-F317 (1994)

Wood, I.S., Ford, L.T., Penny, J.I. and Shirazi-Beechey, S.P. Characterisation of a Na⁺-dependent phosphate cotransporter from ovine renal outer cortex Unpublished

Wu, H., Parsons, J.T. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* **120**(6):1417-26 (1993)

Zitzer, H., Richter, D., Kreienkamp, H.J. Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin-binding protein 1. *J Biol Chem* **274**(26):18153-6 (1999)

Danksagung

Das Zustandekommen dieser Arbeit wurde durch die Unterstützung vieler Freunde und Kollegen erleichtert. Ich möchte hierfür allen herzlich danken. Besonders möchte ich folgende Personen hervorheben:

Herrn PD Dr. Andreas Werner, der mir das Thema der Dissertation zur Verfügung stellte und immer für ausgiebige Diskussionen jeder Art bereit war. Die Arbeit in seinem Labor bedeutet für mich nicht nur eine wissenschaftliche, sondern auch eine persönliche Weiterentwicklung.

Herrn Prof. Kreiser (Universität Dortmund), der freundlicherweise bereit war, das Korreferat zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Rolf Kinne, der mir die Möglichkeit gab, am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zu arbeiten und mit viel Interesse meine Arbeit begleitet hat.

Frau Perihan Nalbant, die ich während der engverbundenen Arbeit mit ihr im Labor immer besser kennen und lieben gelernt habe. Sie hat mich in jeder Hinsicht unterstützt.

Frau Mitra Hagnia, welche während ihrer Diplomarbeit mit großem experimentellen Aufwand die Funktion von C160/Shank3b in OK-Zellen untersuchte.

Die weiteren (Ex-)Mitglieder der Arbeitsgruppe Werner, mit Birgit Hülseweh, Beate Kohl, Heike Rimpel, Beate Schöllermann und Ursula Strunk, die für ein freundliches Arbeitsklima sorgten und mich in vielen, kleinen Dingen unterstützten.

Frau Prof. Brigitte Kaissling (Universität Zürich-Irchel), Herrn Martin Traebert und Herrn Dr. Jan Loffing, welche mich in die Techniken der Immunhistochemie eingewiesen haben.

Frau PD Dr. Eva Kinne-Saffran, die freundlicherweise Membranpräparationen von Maus und Rattennieren angefertigt hat.

Herr Dr. Peter Herter und PD Dr. Hartmut Hentschel, für die Anfertigung von Paraffinpräparaten.

Herrn Alexander Giffey und Frau Dr. Hanna Tinel, die mir bei den technischen Problemen am konfokalen Laserrastermikroskop behilflich waren.

Frau Walburga Hecker und Frau Anders für die DNA-Sequenzierung und die Synthese der Oligonukleotide.

Nicht zuletzt meinen Eltern, Martin und Maria Grude und meinen Brüdern Eddi und Robin, die mir Rückhalt gaben, ohne den die Arbeit nicht hätte fertiggestellt werden können.

LEBENS LAUF

Name: Leif Dehmelt
Geburtsdatum: 08.01.1972
Geburtsort: Köln
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

August 1978
bis Juli 1982 Grundschule in Köln und Neuhausen a.d.F.

August 1982
bis Mai 1991 Gymnasium in Ostfildern und Dortmund

11. Juni 1991 Abitur

Studium:

Oktober 1991
bis Juni 1997 Studium Chemie-Diplom an der Universität Dortmund

(dazwischen: Zivildienst bei dem Deutschen Roten Kreuz in Dortmund von März
1992 bis Mai 1993)

21. Oktober 1994 Diplomvorprüfung in Chemie

Dezember 1996
bis Juni 1997 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
Dortmund, Abteilung Epithelphysiologie, Prof. Dr. R. K. H. Kinne in
der Gruppe von PD Dr. A. Werner über "Klonierung, Überexpression
und Untersuchungen zur Struktur des potentiell regulatorischen Peptids
Ipan", betreut durch Prof. Dr. R. P. Kreher, Universität Dortmund

25. Juni 1997 Diplom-Prüfung

September 1997
bis Mai 2000 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,
Dortmund, Abteilung Epithelphysiologie, Prof. Dr. R. K. H. Kinne in
der Gruppe von PD Dr. A. Werner über "Identifizierung und
Charakterisierung von Interaktionspartnern des Na⁺/Phosphat
Kotransporters Typ II", betreut durch PD Dr. A. Werner und Prof. Dr.
W. Kreiser, Universität Dortmund