

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner

**Die Sortierung der menschlichen, nicht gastrischen H⁺,K⁺-ATPase, ATP1A1,
in Nierenepithelzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Lerner, Markus
aus Borken
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Martin Hausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2005

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht unter:

Lerner M., Bertram H., Kosch M., Reinhardt J.

“Regulation of surface expression of the human nongastric H⁺,K⁺-ATPase, ATP1A1, in renal epithelial cells”. Pflügers Archiv 441, No. 6: R 230/P29-9 (2001), © Springer-Verlag, Berlin.

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner-

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner
Koreferent: Priv. Doz. Dr. med. Martin Hausberg

ZUSAMMENFASSUNG

Die Sortierung der menschlichen, nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPase, ATP1AL1,
in Nierenepithelzellen

Markus Lerner

Nierenepithelzellen verfügen über strukturell und funktionell unterschiedliche Plasmamembrandomänen, die u.a. den vektoriellen Stofftransport über die Epithelbarriere ermöglichen. Essentiell in der Etablierung differenzierter Membranen ist deren Ausstattung mit spezifischen Transmembranproteinen. Dieser Prozess erfordert Sortierungssignale, die integrale Bestandteile polarisierter Proteine sein können. Die menschliche, nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase, ATP1AL1, wird vorherrschend in der apikalen Epithelzell-Plasmamembran lokalisiert, wo sie an der K^+ - u. Na^+ - Resorption u. Protonensekretion teilnimmt. Sie zählt wie die Na^+,K^+ -ATPase, die gastrische H^+,K^+ -ATPase und die Ca^{++} - ATPase zur Familie der P-Typ-ATPasen. Während zur Sortierung dieser Transporter schon Daten vorliegen, ist die apikale Sortierung von ATP1AL1 weitgehend unerforscht.

Ziel dieser Arbeit war daher, das Sortierungssignal von ATP1AL1 einzugrenzen und auf diese Weise neue Erkenntnisse über die apikale Proteinsortierung in Epithelzellen zu gewinnen. Mit molekularbiologischen Methoden wurden dazu Chimären zwischen ATP1AL1 und der eng verwandten, aber basolateral sortierten Na^+,K^+ -ATPase, hergestellt und deren Sortierung in stabil transfizierten MDCK-Zellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass vor allem eine Aminosäure in der 2. Ektodomäne (2. ED) für die apikale Sortierung entscheidend ist. Parallel wurde ATP1AL1 über ein gekoppeltes Autofluoreszenzprotein (GFP) auch in vitro untersucht. GFP-ATP1AL1 verhielt sich in allen untersuchten Aspekten wie natives ATP1AL1-Protein. Es konnte gezeigt werden, dass die polare Ausrichtung der ATPase ein Mikrotubuli-abhängiger Vorgang ist und im Gegensatz zu verwandten P-Typ-ATPasen entscheidend von der 2. ED geprägt wird. Basierend auf den gezeigten Ergebnissen sind die apikalen Sortierungssignale vermutlich spezifisch für die Klasse der nicht gastrischen X,K ATPasen.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	2
1.1 Polarität in Epithelzellen.....	2
1.2 P2-Typ-ATPasen	3
1.3 Die nicht gastrische H ⁺ ,K ⁺ -ATPase	5
1.4 Sortierung von Proteinen	8
1.5 Sortierung und Krankheiten	13
1.6 Problemstellung der vorliegenden Arbeit	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien.....	16
2.2 Proteine	17
2.3 Kitsysteme	17
2.4 Arbeitsmaterialien und Geräte	17
2.5 DNAs.....	18
2.5.1 ATPasen-DNA.....	18
2.5.2 Oligonukleotide.....	19
2.5.3 Vektoren.....	19
2.5.4 Die Konstrukte.....	22
2.5.4.5 Klonierung der cDNAs	26
2.6 Präparation der DNA	27
2.6.1 Mikrobiologische Techniken	27
2.6.2 Verwendung von Restriktionsendonukleasen	32
2.6.3 Auftrennung der DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese.....	33
2.6.4 Eluierung der DNA aus einem Agarosegel	35
2.6.5 Phenolextraktion der DNA	35
2.6.6 Präzipitation der DNA	35
2.6.7 Dephosphorylierung	35
2.6.8 Herstellung von „blunt ends“ mit der Klenow-Methode.....	36
2.6.9 Ligation der DNA.....	36
2.6.10 Konzentrationsbestimmung von DNA	37
2.6.11 Einfügen von Punktmutationen über PCR	37

2.7 Proteinanalyse.....	37
2.7.1 Zelloberflächenbiotinylierung.....	37
2.7.2 Proteinbestimmung mit der Amido-Schwarz-Methode.....	39
2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	40
2.7.4 Western Blot.....	41
2.7.5 Immunfluoreszenz.....	41
2.7.6 Mikroskopie.....	42
2.8 Zellkultur.....	43
2.8.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	43
2.8.2 Die MDCK-Zelllinie.....	44
2.8.3 Nährmedien, Zusätze und Puffer.....	44
2.8.4 Kulturbedingungen.....	45
2.8.5 Stimulation der Proteinexpression mit Natriumbutyrat.....	45
2.8.6 Splitten und Aussähen von Zellen.....	45
2.8.7 Einfrieren und Lagerung von Zellen.....	45
2.8.8 Zellzahlbestimmung.....	46
2.8.9 Beschichtung von Glas-Oberflächen.....	46
2.8.10 stabile Transfektion von MDCK-Zellen.....	47
2.8.10.1 Einzel- und Doppel-Transfektion mit DOTAP.....	47
2.8.10.2 Selektion transfizierter Zellen.....	47
2.8.10.3 Einzelzellklonierung.....	48
3. Ergebnisse.....	49
3.1 Eingrenzung des apikalen Sortierungssignals von ATP1AL1.....	49
3.2 Vergleich des Fusionsproteins GFP-ATP1AL1 mit ATP1AL1.....	53
3.3 In vivo Transport von ATP1AL1.....	56
4. Diskussion.....	59
4.1 Die Chimärenstrategie.....	59
4.2 Die Sortierung der Chimären.....	60
4.3 Die Sortierung der Punktmutanten.....	62
4.4 Das basolaterale Sortierungssignal der Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase- α_1	64
4.5 Die Funktion des gefundenen Sortierungssignals von ATP1AL1.....	66
4.6 Die Rolle der β -Untereinheit.....	67
4.7 Die Rolle des Zytoskeletts.....	68

4.8 Der Transportweg von ATP1AL1	69
4.9 Schlussfolgerung und Ausblick	70
5. Literaturverzeichnis.....	72
6. Anhang	I
6.1 Aminosäure- und DNA- Sequenzen	I
6.2 Membrantopologie	VI
6.3 Aminosäure-Uhr	VII
6.4 Lebenslauf	VIII

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Ampr	Ampicillinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMV	Zytomegalievirus
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	liposomales Transfektionsreagenz
ECL	gesteigerte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoreszein-iso-thio-cyanat
FKS	fetales Kälberserum
GFP	grün fluoreszendierendes Protein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
Hepes	Hydroxy-ethyl-piperazine-ethanesulfonic acid
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosidase
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEM	minimal essentielles Medium
Neo ^r	Neomycin (Geneticin)-Resistenzgen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PMA	Phorbol-ester (phorbol 12-myristate 13-acetate)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TJ	Schlußleisten
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-rhodamin-iso-thio-cyanat
Tween 20	Poly-oxythylen-sorbitan-monolaurat
U	Unit (Einheit)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Polarität in Epithelzellen

Epithelzellen bedecken die äußeren und inneren Oberflächen des Körpers. Sie kommen in verschiedenen Ausprägungen in allen Organsystemen, wie z.B. dem respiratorischen, intestinalen, urogenitalen oder dem Gefäßsystem, vor. Das Epithel ist sowohl die Grenzschicht als auch die Verbindung zwischen dem bedeckten Gewebe auf der einen und verschiedensten Stoffen auf der anderen Seite. So bilden Epithelzellen Barrieren und übernehmen gleichzeitig Transportaufgaben, wie z.B. die Absorption und Sekretion von Flüssigkeiten und Elektrolyten. Diese Funktionen spiegeln sich in der typischen Morphologie der Epithelzelle wieder (63), die durch unterschiedliche Membrandomänen charakterisiert ist. Die apikale Plasmamembran stellt die Begrenzung nach außen dar, in Hohlorganen kleidet sie das Lumen aus. Basale und laterale Membrandomänen sind dagegen dem bedeckten Gewebe zugewandt und kommunizieren mit dem Interzellularraum. Obgleich sie funktionell teilweise unterschiedlich sind, werden sie daher oft zur basolateralen Membran zusammengefaßt.

Schon lichtmikroskopisch sind apikale von basolateralen Membrandomänen gut zu unterscheiden. Die apikale Membran besitzt häufig einen Bürstensaum. Von der basolateralen Membran, die dagegen durch teilweise tiefe Einfaltungen ebenfalls ihre Oberfläche vergrößert, ist sie durch die Schlussleisten getrennt. Sie verhindern eine Vermischung von apikalen mit basolateralen Proteinen und Lipiden, durch die beide, sich ständig im Fluß befindlichen, Plasmamembranen charakterisiert werden. Zugleich schließen die Schlußleisten die Zellen zum Epithelverband zusammen und erschweren die transepitheliale Diffusion. Die unterschiedliche Lipid- und Proteinausstattung der apikalen und basolateralen Membran ist essentiell für die Aufgaben der Epithelzelle. Resorption und Sekretion werden erst durch eine asymmetrische Verteilung von Ionenpumpen und Kanälen ermöglicht. Die intestinale Glukoseresorption ist hierfür beispielhaft: im Dünndarmepithel erzeugt die basolaterale Na^+, K^+ -ATPase den Natriumgradienten, durch den der apikale Natrium-Glukose-Symport angetrieben wird. Die hoch organisierten eukaryontischen Zellen könnten nicht funktionieren, würden sich ihre Proteine zufällig im Zytoplasma und in den Membranen verteilen. Die spezifischen Funktionen der einzelnen Zellkompartimente erfordern jeweils ein bestimmtes Sortiment an Proteinen. Die Anordnung der Proteine in ihren spezifischen

Domänen muss daher permanent durch gerichteten Einbau, Retention und Ausbau aufrecht erhalten werden. Dieser Vorgang wird als Sortierung bezeichnet und in der Zelle streng reguliert. Viele Proteine werden daher nicht gleichmäßig verteilt, sondern werden zu ihren typischen Kompartimenten sortiert. Folglich sind sie asymmetrisch in der Zelle angeordnet. Sortierung trägt somit auch zur charakteristischen Polarität der Epithelzelle bei, deren apikale und basolaterale Plasmamembranen unterschiedlich mit Rezeptoren, Ionenpumpen und Kanalproteinen ausgestattet sind.

1.2 P2-Typ-ATPasen

Eine funktionell bedeutende Klasse von Ionenpumpen sind die P-Typ-ATPasen (P1, P2, P3). Sie phosphorylieren sich durch ATP reversibel selbst und nutzen so chemisch gebundene Energie zum Ionentransport und Aufbau transmembraner Ionengradienten (4;16;49). Eine herausragende Untergruppe sind die P2-Typ-ATPasen. Sie umfassen Kationentransporter wie die Ca^{2+} -ATPasen der Plasmamembran, des sarko- und endoplasmatischen Retikulums, sowie Na^+ , K^+ -, gastrische und nicht gastrische H^+ , K^+ -ATPasen. In dieser Familie zeigen die „Natrium oder Wasserstoff gegen Kalium“-austauschenden „X,K-ATPasen“ untereinander die größte Strukturähnlichkeit. Es sind Oligomere, die im Gegensatz zu den monomeren Ca^{2+} -ATPasen aus zwei verschiedenen Untereinheiten, Alpha und Beta, zusammengesetzt sind. Anhand der Kristallisation der Ca-Pumpe aus dem endoplasmatischen Retikulum (77) und anderer Strukturanalysen (5;9;48) konnte die Membrantopologie der P2-Typ-ATPasen bestimmt werden. Die katalytische α -Untereinheit (~ 110 kDa) ist nicht glykosyliert und weist zehn Transmembrandomänen auf. Sie beinhaltet die Bindungsstelle für ATP und die Phosphorylierungsstelle.

Die β -Untereinheit ist unterschiedlich stark glykosyliert (34-65 kDa) und durchzieht die Plasmamembran nur einmal in einer Typ-II Orientierung, so dass der lange C-Terminus extrazellulär liegt. Dieser erhält seine Form durch sechs bei allen Isoformen konservierte Cysteinreste, die untereinander drei Disulfidbrücken ausbilden. Über ihren C-Terminus ist die β -Untereinheit an nur eine einzige, 26 AS lange, extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit gebunden (29;30;46;80). Die Dimerisierung findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Die α -Untereinheit ist im Gegensatz zur β -Untereinheit nicht in der Lage, ohne Partner das ER zu verlassen, da Beta die notwendigen Signale zur ER-Ausschleusung trägt. Darüber hinaus ist Beta für die

korrekte Proteinfaltung und Stabilisierung der ganzen ATPase in der Plasmamembran notwendig.

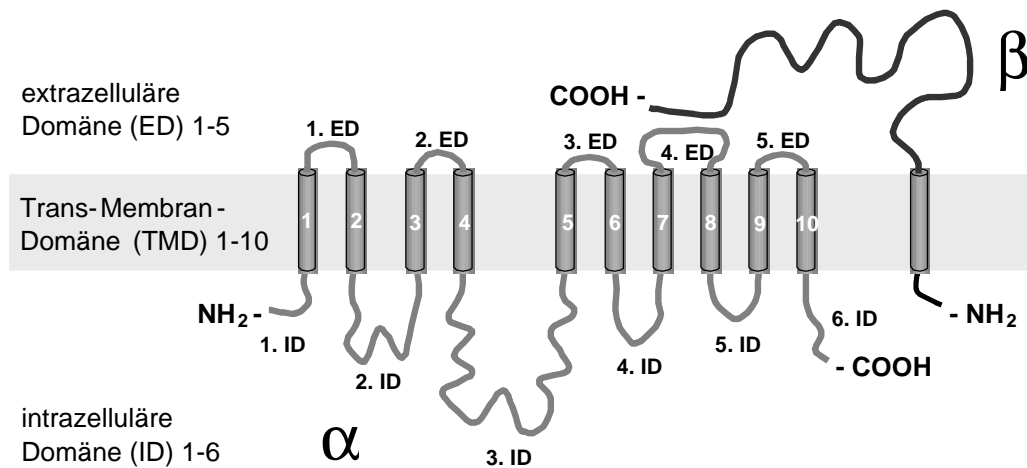


Abb. 1.1:

Modell der α - und β -Untereinheit der heterodimeren X,K-ATPase

Zwar besitzt die β -Untereinheit selbst, wie auch die α -Untereinheit, Sortierungssignale, doch sind diese für das Holoenzym nicht dominant. Wird z.B. die β -Untereinheit der apikalen gastrischen H⁺,K⁺-ATPase in MDCK-Zellen separat exprimiert, wird sie zur basolateralen Membran sortiert. Dagegen wird das Holoenzym, bestehend aus α - und β - Untereinheit der gastrischen H⁺,K⁺-ATPase, vorherrschend in die apikale Plasmamembran von MDCK-Zellen eingebaut (61).

Obgleich die X,K-ATPasen in vielen Aspekten übereinstimmen, werden sie dennoch unterschiedlich in der Plasmamembran platziert, um ihrer physiologischen Rolle gerecht werden zu können. Dabei ist ihre Verteilung asymmetrisch. Beispielsweise definiert die ubiquitär vorkommende Na⁺,K⁺-ATPase in fast allen Epithelzellen die basolaterale Membran, wo sie für viele weitere Transportprozesse einen elektrochemischen Gradienten schafft. Dagegen sorgt in den Parietalzellen die gastrische H⁺,K⁺-ATPase nur in der apikalen Plasmamembran für die Azidifizierung des Magensaftes.

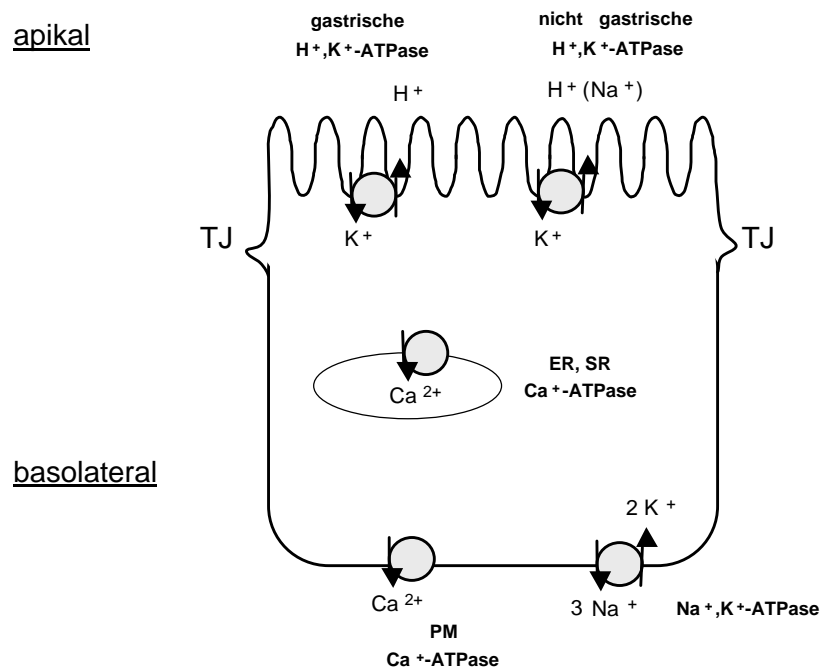


Abb. 1.2:

Verteilung und Funktion der P2-Typ-ATPasen in der polarisierten Epithelzelle. Apikal: gastrische und nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase. Basolateral: Na^+,K^+ -ATPase, PM (Plasmamembran) $-Ca^{2+}$ -ATPase. Membran des Endo- und Sarkoplasmatischen Retikulums (ER, SR): ER, SR $-Ca^{2+}$ -ATPase.

1.3 Die nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase

Zu den P2-Typ-ATPasen gehört auch die wachsende Gruppe der nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPasen, die bereits aus verschiedenen Spezies (Meerschweinchen, Maus, Ratte, Kaninchen und Amphibien) kloniert werden konnten. Die α -Untereinheit der einzigen menschlichen Form wurde 1988 auf Chromosom 13 nachgewiesen und kloniert (82). Sie wird unter anderem wie ihr Gen „ATP1AL1“ (Alpha-Like 1) bezeichnet. Spezies übergreifend sind die nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPasen eng miteinander verwandt. Die Identität der Aminosäuresequenzen zu ATP1AL1 reicht von 75% (Kröte) bis zu 88% (Meerschweinchen).

Zwischen ATP1AL1 und den anderen humanen P2-Typ-ATPasen besteht ebenfalls eine enge Verwandtschaft. Besonders zur Na^+,K^+ -ATPase (Isoformen 1-3) und zur gastrischen H^+,K^+ -ATPase ist die Aminosäureidentität mit jeweils ~63% Übereinstimmung hoch. Im Vergleich zu den verschiedenen Ca^{2+} -ATPasen des endoplas-

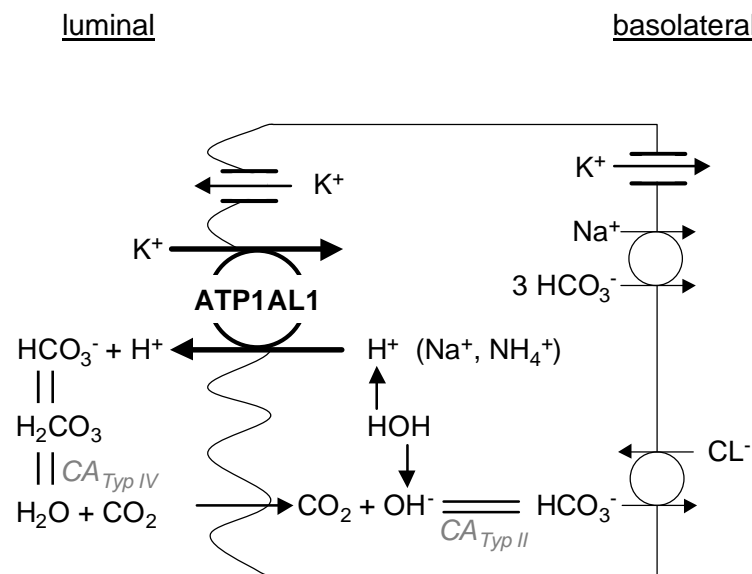
matischen Retikulum (Serca A-F) finden sich dagegen trotz der vergleichbaren Proteinstruktur nur 23% bis 27% identische Aminosäuren.

Eine für die menschliche nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase spezifische β -Untereinheit ist bislang nicht bekannt. ATP1AL1 konnte jedoch zusammen mit der β -Untereinheit der gastrischen H^+,K^+ -ATPase in verschiedenen Zellsystemen, u.a. MDCK, LLC-PK1 (44;61), HEK 293 (21;34), *Xenopus laevis* Oozyten (1;21), SF-21-Insektenzellen (1), exprimiert werden. Eine schwächere Assoziation der α -Untereinheit wurde mit der kotransfizierten Na^+,K^+ -ATPase- β_1 beobachtet, die u.a. endogen im distalen Kolon der Ratte vorkommt. Dort wurde sie funktionell ebenfalls apikal lokalisiert und wird deswegen als möglicher spezifischer Partner zur nicht gastrischen, kolonischen, H^+,K^+ -ATPase- α der Ratte angesehen (18;34;61).

Die Erforschung der physiologischen Rolle der nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPase steckt im Vergleich zur Na^+,K^+ - und gastrischen H^+,K^+ -ATPase immer noch in ihren Anfängen. Trotz der großen Homologie unterscheidet sie sich in vielen Aspekten von diesen engen Verwandten. Daher werden die nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPasen als eine selbständige Gruppe und nicht als Isoformen der Na^+,K^+ - oder der gastrischen H^+,K^+ -ATPase angesehen. ATP1AL1 ist mit diesen zwar gleichermaßen verwandt (~63% Homologie), grenzt sich aber u.a. pharmakologisch von ihnen ab. Während die Na^+,K^+ -ATPase bereits auf nanomolare Konzentrationen des Glykosids Ouabain (Strophantin G) reagiert, aber weder durch das Imidazol-Pyridin-Derivat „Schering 28080“ (SCH 28080) noch den Protonenpumpenhemmer Omeprazol blockiert werden kann, ist die gastrische H^+,K^+ -ATPase nahezu unempfindlich für Glykoside, wird jedoch sowohl durch SCH 28080 als auch Omeprazol [K_i ~100 nM] inhibiert.

Funktionellen Messungen zufolge ist ATP1AL1, kotransfiziert mit der β -Untereinheit der gastrischen H^+,K^+ -ATPase, sowohl sensitiv für höhere Ouabain- [K_i ~42 μ M] als auch für sehr hohe SCH 28080- Konzentrationen [K_i ~131 μ M] (34;52). Die Eigenständigkeit von den nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPasen innerhalb der Gruppe der X,K-ATPasen zeigt sich auch in einer Besonderheit ihrer Transportfunktion: neben ihrer Fähigkeit, H^+ im Austausch gegen K^+ zu transportieren, können sie auch als Na^+,K^+ -ATPase funktionieren (20;35) und werden somit als $H^+/Na^+,K^+$ -ATPasen klassifiziert.

Der Ionenaustausch erfolgt nach der Reaktionsgleichung: $ATP + H_2O + H^+_{iz}$ (bzw. Na^+_{iz}) + $K^+_{ez} = ADP + P + H^+_{ez}$ (bzw. Na^+_{ez}) + K^+_{iz} . Für einen dritten Transportmodus, nämlich den Austausch von NH_4^+ gegen K^+ , gibt es Hinweise. Hierbei verlässt das aufgenommene Kalium die Zelle über einen apikalen Kaliumkanal (ROMK 1) (19;68).

**Abb. 1.3:**

Modell der möglichen Funktionsweise von ATP1A1 in der apikalen Plasmamembran einer Zwischenzelle im Sammelrohr, modifiziert nach Silver et al. (84). Unter Kaliumdepletion ist die Aktivität von ATP1A1 gesteigert, während die der Kaliumkanäle unterdrückt ist (31).

Unter physiologischen Bedingungen ist das Expressionsniveau der nicht gastrischen H⁺,K⁺-ATPase schwach, und die Funktion als Na⁺,K⁺-ATPase steht wahrscheinlich im Vordergrund (20;35). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie Kalium- oder Natriumdepletion, kommt es hingegen zu einer vermehrten Expression. Knock-out Mäuse, denen die nicht gastrische H⁺,K⁺-ATPase fehlt, entwickeln unter kaliumfreier Diät schneller eine Hypokaliämie als der Wildtyp (51). Am Ratten- und Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die nicht gastrische H⁺,K⁺-ATPase im distalen Kolon wahrscheinlich zur Rückresorption des Kaliums dient, das bei Natriumrestriktion im proximalen Kolon aldosteronvermittelt ausgeschieden wird (68;72).

Beim Menschen wurde die nicht gastrische H⁺,K⁺-ATPase in verschiedenen Geweben auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen. In der Niere findet sich ATP1A1 hauptsächlich im Sammelrohr, wo das Protein vorherrschend in den Zwischenzellen lokalisiert ist (44). Dort und im distalen Tubulus findet die flexible Kaliumreabsorption statt, durch die die in engen Grenzen gehaltene Kaliumkonzentration feinreguliert wird.

Darüber hinaus sind die Zwischenzellen des Typs A an der pH-Regulation über Säureausscheidung beteiligt. Dazu benötigen sie in ihrer luminalen Membran einen Transportmechanismus für die aktive Ausscheidung von Protonen. So könnte unter anderem auch die nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase für die Azidifizierung des Endurins sorgen. Weiter wurde die Ionenpumpe in der Haut und im Gehirn detektiert, wo ihre physiologische Funktion noch nicht geklärt ist. Sie könnte dort an der Schweißsekretion bzw. an der Regulation der Liquorzusammensetzung beteiligt sein. Im Gegensatz zu anderen Spezies, bei denen eine starke Expression der nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPase im distalen Kolon gezeigt werden konnte, wurde beim Menschen ATP1AL1 im Kolon bisher nur in Karzinomzellen nachgewiesen (59;75).

ATP1AL1 wurde in verschiedenen Expressionssystemen untersucht. Dabei stellte sich die apikale Lokalisation in Epithelzellen als ein wichtiges Merkmal dieser Ionenpumpe heraus. Diese uniforme Verteilung scheint unter den schon beschriebenen pathophysiologischen Bedingungen, vor allem bei K^+ -Depletion, besondere Bedeutung für die Zelle zu erlangen. Über die apikale Membran kann das Epithel so verstärkt aktiv Kalium resorbieren und Natrium oder Wasserstoff sezernieren. Die Mechanismen, welche diese entscheidende apikale Verteilung der nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPase bedingen, sind bislang noch unerforscht.

1.4 Sortierung von Proteinen

Eine enorme Leistung der eukaryontischen Zelle ist der ständige Transport der Proteine an ihre Zielorte. Sie hat effiziente Mechanismen entwickelt, verschiedenste Proteine, die beispielsweise zur Sekretion, Integration in die Plasmamembran oder für den Einbau in die unterschiedlichen intrazellulären Kompartimente bestimmt sind, spezifisch zu sortieren. Obgleich viele Sortierungsprozesse bisher nur skizzenhaft beschrieben werden können, sind einige allgemeine Mechanismen der Proteinsortierung bekannt. Im Folgenden wird besonders auf die Sortierung von Transmembranproteinen eingegangen.

Wie bereits erwähnt, besitzen Zellen einen Sortierungsapparat, der die polare Verteilung von Proteinen gewährleistet. Dieser umfaßt alle Strukturen, die das Protein zum Zielort transportieren, es dort stabilisieren oder falsch lokalisierte Proteine endozytieren und anschließend degradieren oder umverteilen. Folglich handelt es sich um ein komplexes System, das die Proteinverteilung auf verschiedenen Stufen regulieren kann. Transmembranproteine können nach der Synthese im ER und der sich anschließenden Prozessierung im Golgi-System auf zwei Wegen zur Zielmembran

gelangen. Entweder werden sie direkt zur apikalen oder basolateralen Membran transportiert, oder sie gelangen indirekt über Transzytose an ihren Zielort.

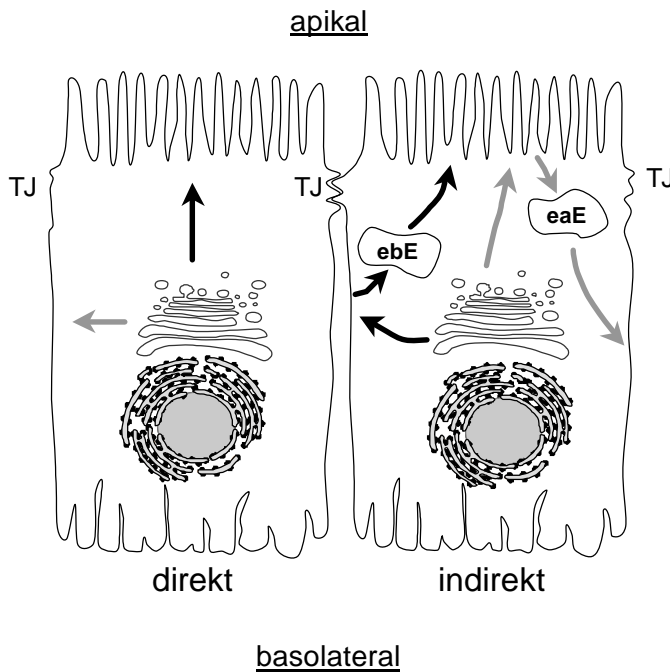
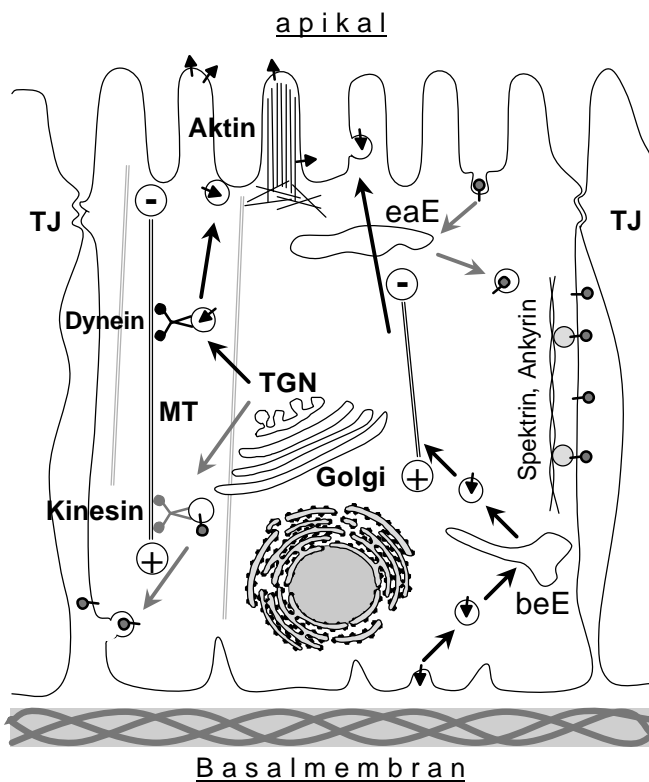


Abb. 1.4:

Modell des direkten und indirekten apikalen (schwarz) u. basolateralen (grau) Transportweges in polarisierten Epithelzellen. (TJ=Tight junctions, ebE = early basolateral endosome, eaE = early apical endosome)

Bei der Transzytose werden die Proteine nach transientem Einbau in die Plasmamembran durch Endozytose aus dieser entfernt, um über die Zwischenstation der „early endosomes“ in die Zielmembran transportiert werden zu können. Dieser Mechanismus ist besonders in Hepatozyten ausgeprägt. Direkter und indirekter apikaler Transport sind häufig auf das Mikrotubulussystem angewiesen, wohingegen der basolaterale Transportweg für die meisten Proteine davon unabhängig funktioniert (27;50;67;79;83).

Mikrotubuli bestehen aus polarisiert angeordneten Dimeren. Die schnell wachsenden Plus-Enden zeigen in polarisierten Zellen nach basal, während die Minus-Enden zum apikalen Zellpol ausgerichtet sind. Dagegen verlaufen in nicht polarisierten Zellen die Mikrotubuli vom Kern zur Plasmamembran und die Plus-Enden liegen an der gesamten Zellperipherie. Die Motorproteine Dynein und Kinesin bewegen sich ATP-abhängig entlang der Mikrotubuli in entgegengesetzte Richtungen (45). Motorprotein-Rezeptoren vermitteln die Wechselwirkung mit den Transportvesikeln.

**Abb. 1.5:**

Zellmodell mit Sortierungskomponenten. Apikale Proteine (\blacktriangle) gelangen vom TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) in Vesikeln u.a. über MT (Mikrotubuli) direkt und indirekt zur Zellmembran. Basolaterale Proteine (\blacktriangledown) werden dagegen meist MT-unabhängig transportiert. Transzytose findet über die Zwischenstation der „Endosomes“ (early apical endosome, early basolateral endosome) statt.

Eine andere Komponente des Zytoskeletts ist das Aktingerüst. Es liegt teilweise direkt unter der Plasmamembran und ist dadurch an der Ausbildung der Zellform beteiligt. Aktinfilamente unterstützen z.B. die charakteristische Ausformung des Bürstensaums intestinaler Epithelzellen. Aktin ist mit Spektrin assoziiert. Das Spektringerüst ist über verschiedene Ankyrine an Membranproteine gebunden und kann diese, wie auch die Plasmamembran selbst, stabilisieren. Die basolaterale Na^+, K^+ -ATPase wird auf diese Weise in Epithelzellen über Ankyrin am Spektringerüst und den Aktinfilamenten verankert (12;24;25;55;76;81).

Neben dem vielfältigen Zytoskelett spielt auch die Zusammensetzung der Plasmamembran selbst eine entscheidende Rolle für die Sortierung von Proteinen. Die Lipidzusammensetzung apikaler und basolateraler Membranen unterscheidet sich in charakteristischer Weise voneinander. Beispielsweise ist die apikale Membran von Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt reich an Glykosphingolipiden, die die exponierte Zelloberfläche vor dem sauren Milieu und vor den Verdauungsenzymen schützen. Dagegen weist die basolaterale Membran mehr Phosphatidylcholin und Sphingomyelin auf (70).

Nach der „rafts-Theorie“ (14;69) ist eine bestimmte Lipidkomposition Voraussetzung für die apikale Sortierung von Proteinen, die in glykosphingolipidreichen Mikrodomänen akkumulieren. Ein Beispiel hierfür sind die über Glykosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) verankerten Proteine. GPI-Anker vermitteln zuerst die Assoziation der Proteine mit den sogenannten „lipid rafts“, die im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) durch Anhäufung von Glykosphingolipiden und Cholesterol gebildet werden. Mit ihrem selektiven Proteininhalt fusionieren diese rafts mit der apikalen Plasmamembran. Auf der extrazellulären Seite werden die Proteine dann durch die GPI-Anker stabilisiert (13).

Einige Transportvesikel werden in der Zelle ihrer Zielmembran durch „snare“-Proteine (Schlingenproteine) zugeordnet. Die v-snares (vesicle) binden an die entsprechenden Rezeptoren in der Membran, den t-snares (target). Es gibt verschiedene membranspezifische t-snares, von denen hier beispielhaft für die MDCK-Zelllinie nur das apikale Syntaxin-3 und das basolaterale Syntaxin-4 genannt sein sollen.

Die Zelle verfügt über viele organisierte Strukturen, die sie für den gerichteten Transport ihrer Proteine nutzt. Transportweg und Zielort sind dabei durch Sortierungssignale definiert, die integrale Bestandteile des Proteins sind. Sie sind genetisch kodiert und werden in die Aminosäuresequenz eingebaut. Diese Vorstellung von den sogenannten „ZIP-Codes“, Aminosäuresequenzen, die Proteine an ihre Zielorte in der Zelle adressieren, wurde erstmals 1971 von Blobel formuliert und 1975 beschrieben (10;11). Diese Signalthypothese ist heute allgemein anerkannt und hat sich zu einem Prinzip der Zellphysiologie entwickelt.

ZIP-Codes sind universal. Sie sind Teil tierischer, pflanzlicher und bakterieller Proteine. Auch Viren verfügen über spezifische, in ihre Hüllenproteine integrierte, Adressierungssignale. Durch sie erhalten sie Zugang zu den Organellen der Wirtszelle, die dann die Virusproteine, zelleigenen Proteinen ähnlich, transportieren, wie es u.a. beim HI- und Coronavirus (2;64) festgestellt wurde.

Bisher gelang die Identifizierung vieler sortierungsrelevanter Proteindomänen. Nach bisherigen Erkenntnissen sind apikale Sortierungssignale vorwiegend in luminalen und transmembranösen Proteindomänen lokalisiert, während Signale für die basolaterale Sortierung eher in zytoplasmatischen Proteinbereichen zu finden sind.

Basolaterale Signale bestehen häufig aus einem Tyrosinrest, der die Form N,P,X,Y oder Y,X,X, Φ hat (N=Asparagin, P=Prolin, X=jede AS, Y=Tyrosin, Φ =hydrophobischer Rest). Diese Sequenzen vermitteln die Assoziation mit vesikelspezifischen Adapterproteinen. Eine weitere Signalsequenz besteht in einer Dileucin-Gruppe, die auf

ähnliche Weise funktioniert. Basolaterale Signale verhalten sich gegenüber apikalen häufig dominant.

Die Verankerung einiger Proteine in der apikalen Plasmamembran erfolgt über PDZ-Proteine (benannt nach den ersten bekannten Vertretern dieser Gruppe: PSD95, Dig, und ZO-1). Sie werden aber auch von basolateralen Proteinen benutzt. PDZ-Proteine besitzen 80-100 AS lange, konservierte Domänen, die an Konsensussequenzen der Zielproteine binden. Diese lauten „S/T, X, L, V/I/M“ oder „F/Y, X, F/Y/A“ (S=Serin, T=Threonin, L=Leucin, V=Valin, I=Isoleucin, M=Methionin, F=Phenylalanin). Das CFTR-Protein, der Natrium-Phosphat-Kotransporter und der GABA-Transporter GAT-3 scheinen so apikal stabilisiert und evtl. sogar auf diese Weise sortiert zu werden (32).

Nach einer neueren Theorie können Tyrosin-basierte Signale auch als apikale Sortierungsinformation funktionieren, wie es für das Membranprotein „Megalin“ kürzlich beschrieben wurde. Dies lässt weiter vermuten, dass gleich kodierte Proteine mehrere Sortierungsinformationen besitzen, die zellspezifisch erkannt und genutzt werden (15). Ein entscheidender Startpunkt des Sortierungsprozesses scheint das TGN zu sein (37), wo eine Verpackung der Proteine in spezifische Transportvesikel stattfinden kann. Ebenso spielen viele andere Mechanismen, über die z.B. Proteine endozytiert und degradiert oder umverteilt werden, eine wichtige Rolle bei der Erhaltung ihrer Polarität. Die Aktivität vieler Transmembranproteine wird über Endozytose und Recycling reguliert, wie es klassisch für die gastrische H^+,K^+ -ATPase beschrieben ist. Dieser „Turnover“ kann erhebliche Ausmaße erreichen. Einige Epithelzellen endozytieren pro Stunde etwa 50 % ihrer Proteine, synthetisieren aber nur 5 % neu. Auch beim Recycling der Proteine bleibt die eindeutige Zuordnung zu ihrer spezifischen Membrandomäne von unverzichtbarer Bedeutung.

Die bisher hier beschriebenen Modelle haben Sortierung in einer auspolarisierten Epithelzelle dargestellt. Sortierung und Polarität beeinflussen sich jedoch selbstverständlich gegenseitig und unterliegen auch äußeren Einflüssen. Die links-rechts-Orientierung embryonaler Zellen wird z.B. stark von der spezifischen Sortierung der H^+,K^+ -ATPase mitbestimmt (47). Auch in migrierenden Zellen werden Proteine zu funktionell verschiedenen Plasmamembranen sortiert (60). Epithelzellen, die in vitro frei im Kulturmedium schwimmen, haben eine Kugelform. Nach Zell-Matrix und Zell-Zell-Kontakt werden jedoch schnell Membrandomänen mit spezifischeren Eigenschaften erzeugt, was sich in der prismatischen Form polarer Epithelzellen niederschlägt. Sortierung erzeugt Polarität und gesteigerte Polarität ist häufig Voraussetzung für weitere Sortierung.

1.5 Sortierung und Krankheiten

Forschung auf dem Gebiet „Sortierung“ hat das Verständnis der komplexen Vorgänge in der Zellphysiologie erweitert und zur Klärung vieler unterschiedlicher Krankheitsbilder beigetragen.

Fehler in der Proteinsortierung sind oft mit einer gestörten Polarität der Zelle verbunden. Mögliche Ursachen hierfür können neben einem Defekt im Sortierungsapparat auch fehlerhafte Sortierungssignale im Protein sein. Die Folge ist häufig ein Ausfall des Proteins in seinem Kompartiment, dessen Funktion dadurch beeinflusst wird. Abhängig davon, welche Proteine und Zellarten betroffen sind, können sich verschiedene Krankheiten manifestieren. Beispielsweise konnte beim nephrogenen Diabetes insipidus das Aquaporin-2-Kanalprotein in der basolateralen statt in der physiologisch vorgesehenen apikalen Plasmamembran der Tubuluszellen nachgewiesen werden. Diese Fehlplatzierung verursacht die immensen Flüssigkeitsverluste, die die Krankheit charakterisieren. Einige häufige Mutationen des CFTR-Proteins führen zum Ausbleiben seiner Membranintegration, wodurch das Krankheitsbild der Mukoviszidose entsteht. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über weitere Krankheiten, bei denen Fehler in der Proteinsortierung gezeigt werden konnten.

Auch ATP1AL1 scheint bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine Rolle zu spielen. Bei einer Form der dRTA (distale renale tubuläre Azidose), die mit Hypokaliämie einhergeht, könnte besonders eine defiziente nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase die Symptome erklären (65;71).

Beim „late onset“ Morbus Alzheimer werden Mutationen des ATP1AL1-Gens beobachtet (42). Ob diese Krankheiten mit Sortierungsfehlern von ATP1AL1 verbunden sind, ist unklar. Bei kolorektalen Karzinomen wurde eine stark gesteigerte RNA-Expression von ATP1AL1 beobachtet, was auf einen noch unbekanntem Pathomechanismus hinweist (75). Wichtige Voraussetzung zur Klärung der physiologischen und pathophysiologischen Rolle dieser Ionenpumpe wird daher ein größeres Verständnis ihrer Regulation sein.

Krankheit	Auswirkung von Sortierungsfehlern	Referenz
Mikrovilli-Einschluß-Krankheit	Fehlende Insertion apikaler Proteine besonders in intestinalen Epithelzellen	(3)
Sukrase-Isomaltase-Defizienz Typ IV	Ungerichtete Verteilung des SI-Proteins zu beiden Membrandomänen	(73)
Polyzystische Nierenerkrankung	<ul style="list-style-type: none"> - Abnorme Verteilung der Na⁺,K⁺-ATPase - Abnorm apikales Vorkommen von Cathepsin A u. L. - Intrazelluläres statt membranständiges „Polyzystein“ im Zysten auskleidenden Nierenepithel 	(6) (40) (57)
Distale renale tubuläre Azidose (dRTA)	u.a. apikale statt physiologische basolaterale Verteilung des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers AE1	(22)
Mukoviszidose	u.a. defekter intrazellulärer Transport des CFTR-Kanalproteins zur Plasmamembran.	(17)
Familiäre Hypercholesterinämie	u.a. Missortierung des LDL-Rezeptors zur apikalen, statt basolateralen Membran von Hepatozyten	(43)
Nephrogener Diabetes insipidus	<ul style="list-style-type: none"> - Fehlende apikale Expression des Aquaporin-2 Kanals u. fehlende Membranexpression des Vasopressin-2-Rezeptors - Fehlsortierung des Aquaporin-2-Kanals zur basolateralen Membran von Nierenepithelzellen 	(53) (78)
Morbus Wilson	u.a. Fehlsortierung der Kupfer-transportierenden ATPase „ATP7B“	(28)
Morbus Alzheimer	Zusammenbruch der Sortierung des zytoskelettalen Proteins „Tau“	(74)

Tab.1.1:

Übersicht von Krankheiten, denen Sortierungsdefekte zu grunde liegen.

1.6 Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Thema dieser Arbeit ist die Sortierung der humanen, nicht gastrischen H⁺,K⁺-ATPase. Diese Ionenpumpe ist vorherrschend apikal in Epithelzellen lokalisiert, wo sie an der Protonensekretion und Kaliumresorption beteiligt ist. Das proteinkodierte Signal, das diese uniforme Verteilung in der ausdifferenzierten Plasmamembran bestimmt, ist nicht

bekannt. Seine Identifizierung soll den Sortierungsmechanismus dieser ATPase in der Zelle verdeutlichen und so auch zur Klärung ihrer Regulation in der apikalen Plasmamembran beitragen.

Die Konformation eines Proteins wird durch seine Aminosäuresequenz bestimmt. Ein entscheidender Teil dieser Sequenz ist wahrscheinlich für eine besondere Struktur im Protein verantwortlich, die in der Zelle wie eine Adresse erkannt wird. Da diese Adresse erst im Zusammenspiel mit den unterschiedlichen Zellorganellen wirksam wird, ist ihre Identifizierung ein wichtiger Schritt, den Transportweg und damit verbundene Regulationsmechanismen ebenfalls zu entschlüsseln.

Um sortierungsrelevante Domänen bestimmen zu können, wurden Chimärenproteine zwischen ATP1AL1 und der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 konstruiert. Diese beiden P2-Typ-ATPasen sind dafür sehr gut geeignet, da sie trotz großer Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen (~ 63 %) unterschiedlich sortiert werden. Die große Strukturähnlichkeit ermöglicht, gleiche Domänen auszutauschen und auf diese Weise ihre Bedeutung für die Sortierung des Proteins zu testen. Diese Methode ist erprobt und führte bei Untersuchungen an der gastrischen H^+, K^+ -ATPase zur Identifizierung eines apikalen Signals in der 4. Transmembrandomäne (26). Analog hierzu entstanden so die ersten ATP1AL1- Na^+, K^+ -ATPase- α_1 -Chimären. Dabei wurde besonders der N-Terminus von ATP1AL1 auf ein apikales Signal hin untersucht. Durch Punktmutationen an den chimeralen Proteinen wurde die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Sortierung getestet. Mit den so künstlich veränderten DNAs konnten über eukaryontische Expressionsplasmide MDCK-Wildtyp-Zellen stabil transfiziert werden. Diese renale epitheliale Zelllinie ist ein exzellentes Modell zur Erforschung von Sortierung, da diese Zellen sich auf Filtern schnell polarisieren und einen dichten Zellrasen ausbilden. Über spezifische Immunfluoreszenz wurde nach Fixierung der Zellen die Verteilung der künstlichen Proteine in der Plasmamembran bestimmt. Ziel war die Identifikation des Sortierungssignals, das ATP1AL1 zur apikalen Membran adressiert. Zur „in vivo targeting“-Darstellung wurde ATP1AL1 mit einem Fluoreszenzprotein (GFP, green fluorescence protein) gekoppelt. Dieses Fusionsprotein wurde mit der β -Untereinheit der gastrischen H^+, K^+ -ATPase ebenfalls stabil in MDCK-Zellen kotransfiziert.

So konnte die Sortierung von ATP1AL1 einerseits mit den Chimären auf proteinkodierte Signale und andererseits mit dem GFP-Konstrukt direkt auch in vivo untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Agarose	Serva /Sigma
Amidoschwarz 10b	Merck
APS	Merck
Ampicillin	Sigma
Bakto Agar	Becton Dickinson, USA
Bakto-Trypton	Becton Dickinson, USA
Chemiluminescence Blotting Substrate(ECL)	Boehringer
Chemiluminescence-Western Blotting Reagenz(ECL)	Boehringer
DABCO (1,4 Diazabicyclo-octane)	Sigma
DMSO	Sigma
DOTAP	Roche
EDTA	Sigma/Aldrich
Ethidiumbromid	Boehringer
Gelatine	Merck/Sigma
Geneticin (G-418)	Gibco
Glutaraldehyd 25 % wäss. Lsg.	Sigma
Glycerin (wasserfrei)	Roth/Merck
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	Becton Dickinson, USA
Hepes	Sigma
Hygromycin B	Invitrogen
Kanamycin	AGS-GMBH
Milchpulver	Fluka
Mowiol	Calbiochem
Natriumbutyrat	Sigma
NHS-Biotin	Bio-Rad
Nokodazol	Sigma
Ouabain	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1)	Gibco
PMA	Sigma
Rotiphorese Gel A und B	Roth
SDS	Merck
Streptavidin	Sigma
Streptavidin-Agarose	Sigma
TEMED	Serva
Triton X 100	Sigma
Tween 20	Sigma

Alle restlichen Chemikalien stammten von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen).

2.2 Proteine

Anti-Digoxigenin Antikörper	Roche
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma
BSA-Standards (1.25-40 µg/10µl)	Sigma
CIP, alkalische Phosphatase	New England Biolabs
Digoxigenin	Roche
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom
Klenow Polymerase	Gibco
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Proteaseinhibitoren	Gibco
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNAse A	Qiagen
RNA-Polymerase-T7	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Boehringer
Taq DNA-Polymerase	Gibco
terminale Transferase	Roche
Trypsin	Biochrom

2.3 Kitsysteme

DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit	Roche
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QuickChange XL-Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rapid DNA-Ligation Kit	Boehringer

2.4 Arbeitsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien

CA-Folie für Amido-Schwarz-Bestimmung	Schleicher&Schuell, Dassel
Chemieluminescencefilm, Hyperfilm™ECL™	Amershampharmacia Biotech, Little Chalfont UK
DNA-Längenstandards	New England Biolabs
Einwegplastikmaterialien	Eppendorf, Hamburg
Elektroporationsküvette (1mm Spalt)	MBP
Gel-Blotting-Paper	Schleicher&Schuell, Dassel
Hybondmembranen (Hybond-c-extra/ Hybond™-N+)	Amersham Life Technologies, Little Chalfont UK
Polaroidfilm 667	Polaroid, St.Albans UK
Saran-Folie	Dow Chemicals

Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Autoklav/ Varioklav	H+P, Oberschleißheim
Bakterieninkubator, Kelvitron t	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5417R -Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Centrikon H-401 -Zentrifuge, A824-Rotor	Kontron, Hermle
Elektrophoresegerät: Power Pac 3000	Biorad, München

Elektrophoresekammer "Mini-2D-Cell"	Biorad , München
Elektrophoresetransfereinheit	Biochrom
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungssofen für Kolonieblot	Biozym, Oldendorf
Magnetrührer	H+P, Oberschleißheim
Microplate reader für 96-well Platten	Molecular Devices
PCR-Cycler	Thermo-Dux, Wertheim
pH-Meter	Orion
Polaroidkamera MP4+	Polaroid, Cambridge MA/USA
Rollinkubator	Toa med. electronics, Japan
Schüttelinkubator HT	Infors, Bottmingen CH
Schutzabzug	Wesemann u. Striepe
Spectrophotometer: UV-160	Shimadzu, Kyoto
UV-Cross linker: UV-Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla
UV-Lampe, Biometra TI 3	Biometra, Göttingen
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Julabo

2.5 DNAs

2.5.1 ATPasen-DNA

DNA	nicht gastrische H ⁺ ,K ⁺ -ATPase- α	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase- α_1	gastrische H ⁺ ,K ⁺ -ATPase- β
Genbank	NM_001676	NM_012504	NM_012510
Organismus	Homo sapiens	Rattus norvegicus	Rattus norvegicus
Gen	ATP1AL1, Chromosom 13	ATP1A1, Chromosom 2	Atp4b, Chromosom 8
Größe (AS)	1039	1023	294

2.5.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid für Chimäre I – Punktmutation AS 314:

5' – c ttc att ctc tct ctg atc ctt aag tat caa gtc ctg gac tcc - 3'

3' – gga gtc cag gac ttg ata ctt aag gat cag aga gag aat gaa g – 5'

Oligonukleotid für Chimäre II – Punktmutation AS 329:

5' - c atc atc gct gtg tcc ctg gag tat acc tgg ctc gag gct g -3'

3' - c agc ctc gag cca ggt ata ctc cag gga cac agc gat gat g -5'

2.5.3 Vektoren

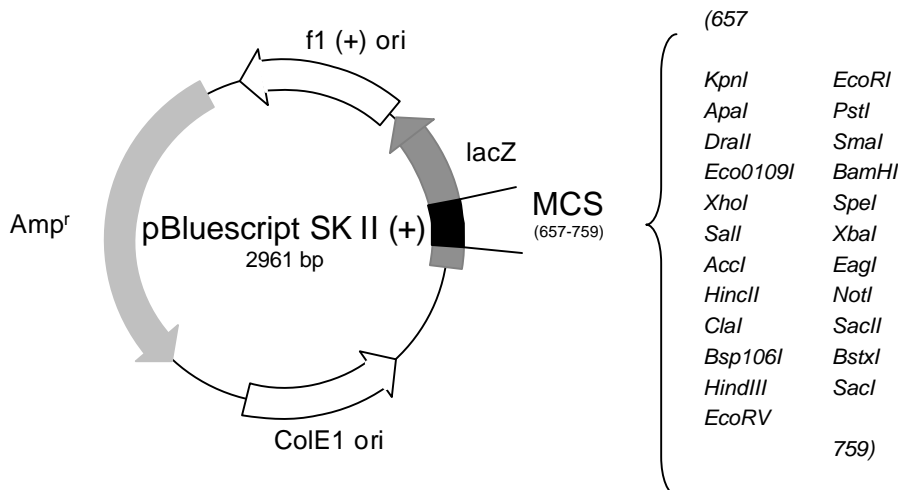


Abb. 2.1: pBluescript II SK (+), (Stratagene, Heidelberg)

Dieser Klonierungsvektor verfügt über eine Polylinkersequenz mit 21 Restriktionschnittstellen. Dieser Bereich ist von T7- und T3-RNA-Polymerase-Promotoren flankiert, die eine RNA-Synthese von der einklonierten DNA in beide Orientierungen ermöglichen. Die Polylinkersequenz liegt zwischen einer b-Galaktosidase-kodierenden Sequenz (*lacZ*), so daß die Einklonierung von DNA zu einer Ausschaltung des *lacZ*-Gens führt. Positive Klone, die auf einem IPTG- und Laktose- haltigem Kulturmedium gewachsen sind, zeigen einen weissen Phänotyp, während negative blau erscheinen. Der Vektor hat einen ColE1 Replikator („high-copy plasmid“) und vermittelt eine Ampicillinresistenz. Über den f1-Replikator kann auch einzelsträngige DNA repliziert werden. Der Vektor eignet sich besonders gut zur Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung der verschiedenen DNA's.

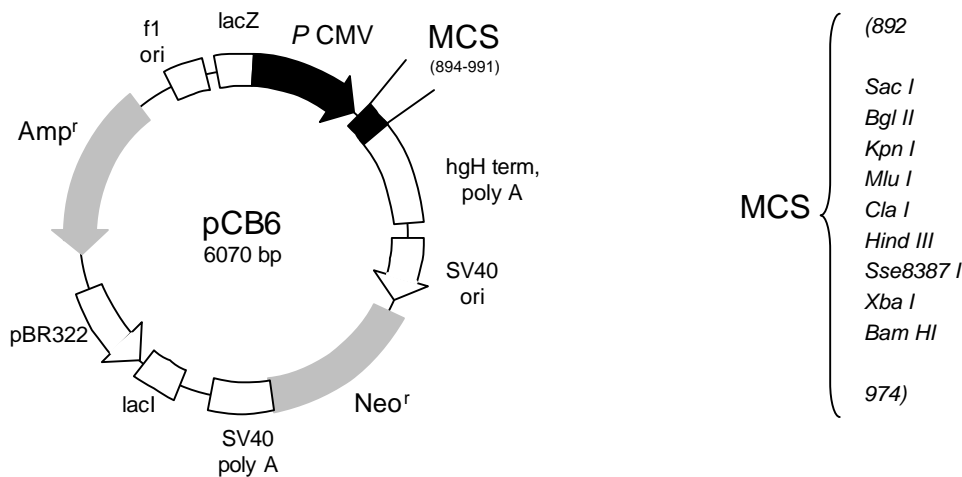


Abb. 2.2: pcB6 (Laboratory of Michael Roth, University of Texas Southwestern)

pcB6 ist ein selektiver Klonierungs- und eukaryontischer Expressions-Vektor. Er ist aus dem pCMV₁ Vektor entstanden. Er hat ein Neomycin- (Geniticin) Resistenzgen für eukaryontische Zellen und ein Ampicillinresistenzgen für Bakterien. Die Polylinkersequenz (MCS) wird upstream von einem CMV-Promotor und downstream von einem Transkriptionsterminierungs- und poly-A –Signal des hGH (human groth hormone) flankiert.

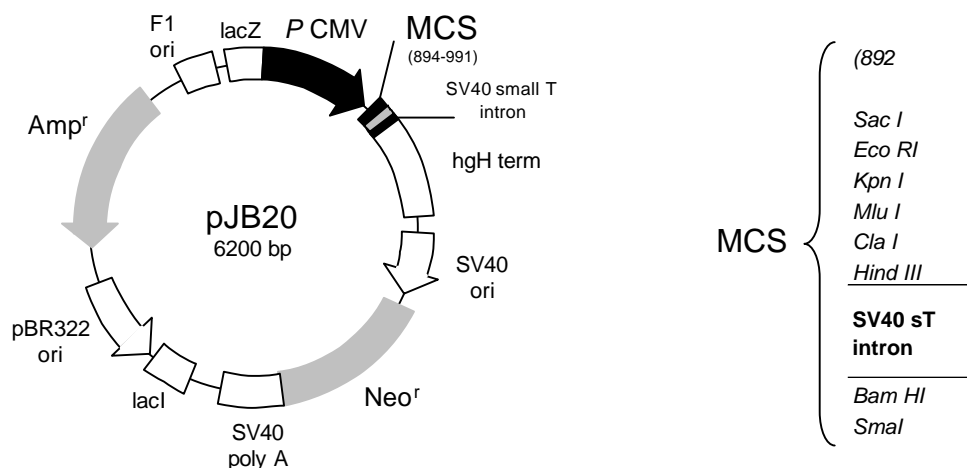


Abb. 2.3: pJB20 (Pamela Beck, Lab. of J. F. Sambrook, Univ. of Texas Southwestern)

pJB20 unterscheidet sich nur gering von pcB6, aus dem er entstanden ist. In der Polylinkersequenz wurde die Bgl II-Schnittstelle entfernt und eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Zwischen Hind III und Bam HI wurde ebenfalls in der MCS das „SV40 small T intron“ eingefügt.

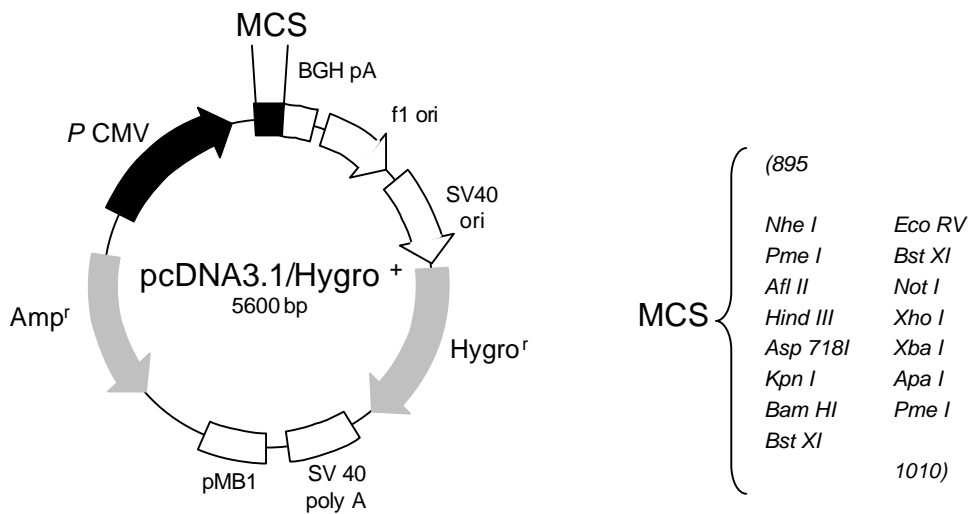


Abb. 2.4: Plasmidkarte, pcDNA3.1/Hygro(+), (Invitrogen, Groningen)

pcDNA3.1/Hygro(+) ist ein selektiver Klonierungs- und Expressionsvektor für eukaryontische Zellen. Zur Selektion in transfizierten Zellen vermittelt der Vektor ein Hygromycinresistenzgen, das von einem SV40-Replikator- und einer Poly-A-Sequenz flankiert ist. Die Transkription der einklonierten Gene wird über einen CMV-Promotor gesteigert und durch das BGH-poly-Signal („Bovine Growth Hormone“) gestoppt. In Bakterien dient das Ampicillinresistenzgen zur Selektion. Durch den pMB1-Replikator ist der Vektor ein „high-copy-plasmid“. Über den f1-Replikator wird die Synthese einzelsträngiger DNA möglich.

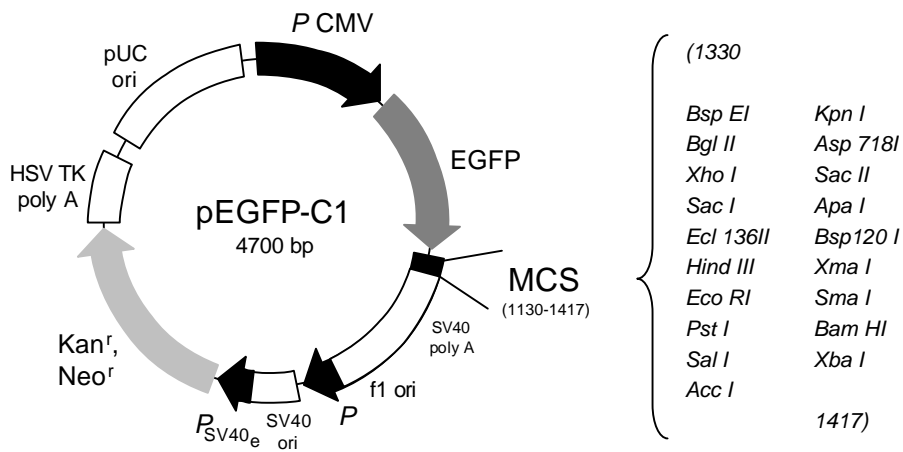


Abb. 2.5: pEGFP-C1 (Clontech)

Zwischen dem CMV-Promotor und der Polylinkersequenz (MCS) befindet sich die Sequenz für das pE-GF-Protein. Diese Variante des „Green Fluorescent Protein“ der

Tiefseequalle *Aequorea victoria* wird mit 488 nm maximal angeregt und hat ein Emissionsmaximum von 507 nm. Die Sequenz wird der einklonierten DNA angelagert. Translate sind somit Fusionsproteine und verfügen über eine Autofluoreszenz, die eine in vivo-Betrachtung der pEGFP-gelabelten Proteine ermöglicht. Der Vektor trägt Resistenzgene für Neomycin in Bakterien und für Geneticin (G418) in eukaryontischen Zellen. Sie werden zur effizienten Transkription von einer SV40 Promotorsequenz und einer SV40-poly-A-Sequenz flankiert. Der f1 Replikator erlaubt die Synthese einzelsträngiger DNA.

2.5.4 Die Konstrukte

In die Originalsequenzen von ATP1A1 und von ATP1AL1 wurden zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingefügt, *AccI* und *HpaI*, die zur späteren Klonierung der Chimären benutzt wurden. Die DNA lag in pBluescript-Plasmiden vor. Folgende Mutationen wurden durchgeführt (Laboratory of M.Caplan, J. Reinhardt):

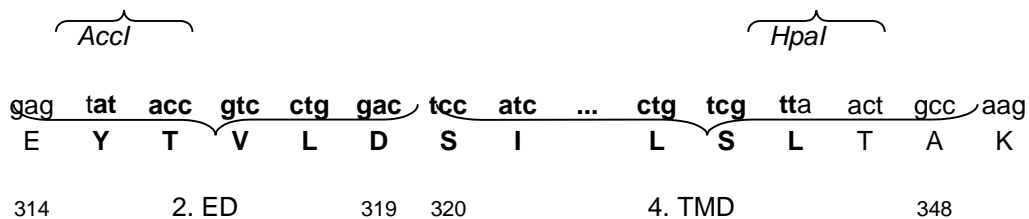
ATP1AL1		329						360				
Nativ	AS:	K	Y	Q	V	L	D	S	L	T		
	Nukleotide:	1152	aag	tat	caa	gtc	ctg	gac	1245	tcg	ctg	aca
<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <i>AccI</i> <i>HpaI</i> </div>												
Mutationen	Nukleotide:	1152	aag	tat	acc	gtc	ctg	gac	1245	tcg	tta	aca
	AS:		K	Y	T	V	L	D		S	L	T

Na⁺,K⁺-ATPase-α_1		314						345				
Nativ	AS:	E	Y	T	W	L	E	T	L	T		
	Nukleotide:	1177	gag	tac	acc	tgg	ctc	gag	1270	acg	ctc	act
<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <i>AccI</i> <i>HpaI</i> </div>												
Mutationen	Nukleotide:	1177	gag	tat	acc	tgg	ctc	gag	1270	acg	tta	act
	AS:		E	Y	T	W	L	E		T	L	T

Durch Einfügen der *AccI*-Schnittstelle in die Sequenz von ATP1AL1 wird zwar Glutamin zu Threonin verändert, doch ist diese Mutation bei den späteren Chimären nicht mehr vorhanden. Die anderen Schnittstellen entstanden durch „silent site mutagenesis“, die AS-Sequenz bleibt hier unverändert. Die Mutationen erfolgten an unterschiedlichen Positionen, die aber strukturell den gleichen Proteinabschnitten entsprechen.

2.5.4.1 Chimäre I

Zwischen *AccI* und *HpaI* wurde die Sequenz von Na^+, K^+ -ATPase- α_1 herausgeschnitten und durch den homologen Teil von ATP1AL1 ersetzt. Dies sind 30 AS, die teilweise die 2. Ektodomäne (2. ED) und fast die ganze 4. Transmembrandomäne (4. TMD) bilden. Am 5'-Terminus wurde zur Unterscheidung von der ubiquitären endogenen Na^+, K^+ -ATPase ein kurzes Peptid der gastrischen H^+, K^+ -ATPase angefügt (Laboratory of M. Caplan, J. Reinhardt).



Das Proteinmodell in der Plasmamembran sieht dann folgendermaßen aus:

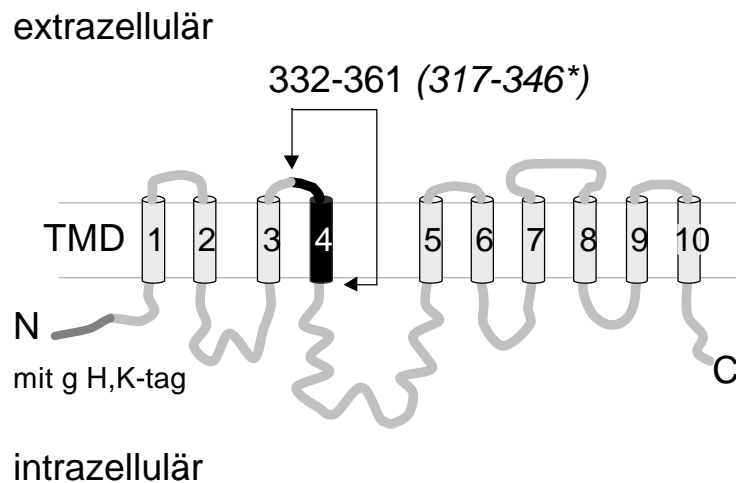
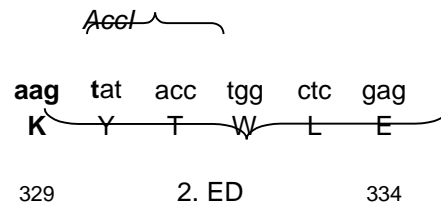


Abb. 2.6:

Chimäre I als Proteinmodell: Aminosäuren 332-361 von ATP1AL1 (schwarz) ersetzen den entsprechenden Teil der Na^+, K^+ -ATPase- α_1^* (grau). Das Peptid der gastrischen H^+, K^+ -ATPase (anthrazid) liegt am N-Terminus.

2.5.4.2 Chimäre II

ATP1AL1 und Na^+, K^+ -ATPase- α_1 werden jeweils mit *AccI* geschnitten. Der 5'Terminus von ATP1AL1 wird mit dem 3'Terminus von Na^+, K^+ -ATPase- α_1 fusioniert. Die Chimäre hat am Fusionspunkt dann folgende Sequenz:



Diese 6 Aminosäuren bilden die 2. Ektodomäne und entsprechen mit Ausnahme des positiv geladenen Lysins (K) von ATP1AL1 der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 , die an dieser Stelle ein negativ geladenes Glutamat (E) besitzt. Das Gesamtmolekül besteht so aus dem N-Terminus von ATP1AL1 („329 AS“) und dem C-Terminus der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 (709 As):

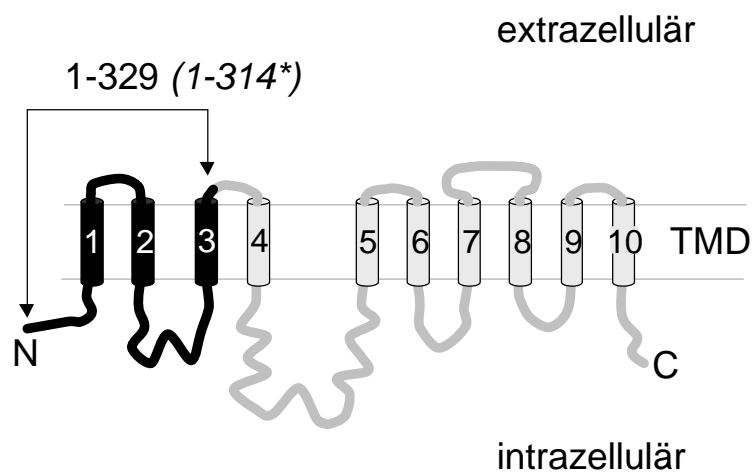


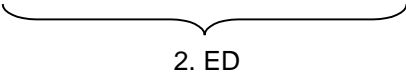
Abb. 2.7:

Proteinmodell der Chimäre II, die aus dem N-Terminus (AS 1-329) von ATP1AL1 (schwarz) und dem C-Terminus (AS 315-1023) der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 (grau) besteht (* ersetzt AS der Na^+, K^+ -ATPase- α_1).

2.5.4.3 Punktmutationen

Über „site directed mutagenesis“ wurden die Chimären I und II an gleicher Position punktmuiert. Verändert wurde jeweils die erste Aminosäure der 2. ED. Diese entspricht Glutamat bei Chimäre I und Lysin bei Chimäre II. Glutamat wurde durch Lysin und umgekehrt Lysin durch Glutamat ersetzt. So entstanden die Punktmutanten Chimäre I-P und Chimäre II-P.

Chimäre I	{	AS:	314	E	Y	T	V	L	D
		Nukleotide:	940	gag	tat	acc	gtc	ctg	gac
Chimäre I-P	{	Nukleotide:	314	aag	tat	acc	gtc	ctg	gac
		AS:	940	K	Y	T	V	L	D
Chimäre II	{	AS:	329	K	Y	T	W	L	E
		Nukleotide:	985	aag	tac	acc	tgg	ctc	gag
Chimäre II-P	{	Nukleotide:	329	gag	tat	acc	tgg	ctc	gag
		AS:	985	E	Y	T	W	L	E



2. ED

2.4.5.4 GFP-ATP1AL1

GFP ist ein modifiziertes autofluoreszierendes Protein der Tiefseequalle. Es hat eine Größe von etwa 25 kDa, wird mit 488 nm angeregt und emittiert Licht im Grünbereich von 568 nm.

ATP1AL1 wurde in das GFP-Plasmid (Clontech) so inkloniert, dass der N-Terminus von ATP1AL1 mit dem GFP-Molekül fusioniert. Dieser liegt dann, zusammen mit dem Fluoreszenzprotein, intrazellulär. Die Fusionsstelle am N-Terminus schien ideal, da andere Proteinbereiche wichtige Aufgaben übernehmen, die bei GFP-ATP1AL1 erhalten bleiben sollten. C-terminal (4. ED) findet z.B. die Assoziation mit der β -Untereinheit statt. Eine zentrale Klonierung könnte dagegen die katalytische Funktion und die Konformation der ATPase stärker beeinflussen. Die gesamte DNA des Konstruktes umfasst 3903 Nukleotide, das entspricht 1301 AS und einem Molekulargewicht von ca. 135 kDa. Abbildung 2.8 zeigt ein Modell des Fusionsproteins.

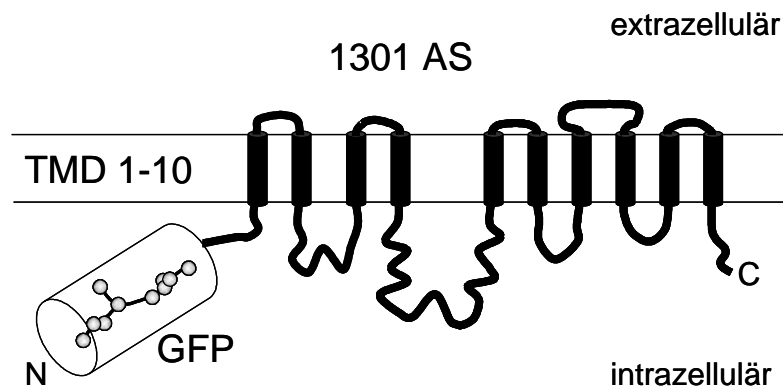


Abb. 2.8:

Struktur von GFP-ATP1AL1 in der Plasmamembran. GFP ist am N-Terminus von ATP1AL1 fusioniert und liegt daher auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran.

2.5.4.5 Klonierung der cDNAs:

Alle Konstrukte wurden in MDCK-Wildtyp-Zellen transfiziert. GFP-ATP1AL1 wurde zusammen mit der beta-Untereinheit der gastrischen H^+,K^+ -ATPase transfiziert, da die Heterodimerbildung Voraussetzung für die Freisetzung des Moleküls aus dem ER ist. Die Chimären können dagegen mit der endogenen $Na^+,K^+-\beta_1$ interagieren, da ihr C-Terminus (4. ED) die Bindungsstellen der Na^+,K^+ -ATPase- α_1 besitzt. Für die Transformation und Transfektion der DNAs wurden die in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Vektoren eingesetzt. Folgende Klonierungen (Tab. 2.1) wurden vorgenommen.

DNA	Vektor	Schnittstellen DNA / Vektor	
		5'-Ende	3'-Ende
<i>ATP1AL1</i>	<i>pJB20</i> <i>pBluescript SK II+</i>	<i>Cla I</i> <i>Xba I</i>	<i>Hind III</i> <i>Hind III</i>
GFP-ATP1AL1	pEGFP-C1	BamH I/Bgl II	Hind III
Chimäre I	pBluescript SK II+ pcB6	Xba I Cla I	Cla I Xba I
Chimäre I-P	pcB6	Cla I	Xba I
Chimäre II	pBluescript SK II+ pcDNA3.1 Hgro+ pcB6	Apa I Spe I/Xba I Hind III	Xba I Xba I Xba I
Chimäre II-P	pcDNA3.1 Hgro+	Spe I/Xba I	Xba I

Tab. 2.1: Klonierung der cDNAs (kursiv: Fremdklone, Jürgen Reinhardt)

2.6 Präparation der DNA

2.6.1 Mikrobiologische Techniken

2.6.1.1 Bakterienstämme

Zur Vervielfältigung von DNA wurden *Escherichia coli* Bakterien chemisch und durch Elektroporation transformiert. Dabei wurden folgende Stämme verwendet:

- XL-1 kompetente *E. coli*
- Max Efficiency DH10B Competent Cells, Life Technologies
- ElectroMAX™DH10B™Cells, Gibco BRL
- XL10-Gold Ultracompetent Cells, Statagene
- selbst hergestellte elektrisch kompetente Zellen

2.6.1.2 Medien, Anzucht und Lagerung von Bakterien

Medium wurde im neutralen pH-Bereich eingestellt, 20 min bei 121°C und gespanntem Dampf autoklaviert, luftdicht verschlossen und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

LB-Medium (1l)	SOB-Medium (1l)	SOC-Medium
10 g Bakto-Trypton	10 g Hefeextrakt	SOB-Medium
5 g Hefeextrakt	20 g Bakto-Trypton	+ 20 mM Glukose
5 g NaCl	10 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10 mM MgCl ₂	
	10 mM MgSO ₄	

Kulturplatten

90 mm Petrischalen wurden mit noch flüssigem LB-Agar ausgegossen. Sie wurden nach dem Aushärten lichtgeschützt verpackt und gewendet bei 4°C gelagert.

LB-Agar: LB-Medium plus 15 g/l Bakto-Agar

Antibiotikazusätze

Für die Selektion wurden die Antibiotika nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf mindestens 47°C den Medien in folgenden Konzentrationen zugesetzt.

Ampicillin (b-Lactamase-AB):	50 µg/ml
Kanamycin (Aminoglykosid):	30 µg/ml

Anzucht von Bakterien auf Kulturplatten

Mit einem desinfizierten und abgeflamten Glasspatel wurden bis zu 200 µl Bakteriensuspension auf LB-Platten ausgestrichen. Die gewendeten Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde Flüssigmedium in verschiedenen Mengen (2 - 50 ml) direkt oder über eine Vorkultur angeimpft und unter Schütteln (225 - 300 rpm) bei 37°C inkubiert.

Lagerung von Bakterien

Kulturplatten mit Bakterienkolonien wurden mit Parafilm versiegelt, gewendet, und bei 4°C mehrere Wochen gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung (mehrere Jahre) wurde zu Bakterien aus einer Flüssigkultur Glycerin in einer Endkonzentration von 15 % gegeben, gründlich durchmischt und bei -70°C in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen eingefroren.

2.6.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Über Nacht wurde in einem Falcon-Tube eine Vorkultur aus XL-1 kompetenten *E.coli* in 3 ml SOB-Medium ohne Magnesium bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Mit 200 µl dieser Vorkultur wurden 200 ml SOB-Medium ohne Magnesium in einem 1000 ml Kolben inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 1 (ca. 4h) wurden die Zellen unter Schütteln auf Eis 10 min lang abgekühlt. Die 200 ml wurden in 4 Zentrifugationsröhrchen umgefüllt. Die Sedimentation erfolgte bei 4°C, 2000 rpm (A8.24-Rotor) und 10 min. Der Überstand wurde abgenommen. Mit dem halben Volumen der Kultur, ca. 100 ml 10 %iger Glycerinlösung, wurden alle Zellen resuspendiert und erneut zentrifugiert (4°C, 2000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen, jedes Röhrchen wurde

nur noch mit 5 ml 10 %iger Glycerinlösung aufgefüllt, um die Zellen zu resuspendieren. Erneut wurde zentrifugiert (4°C, 2000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Der Zellbrei aus den 4 Röhren wurde in einem vereinigt. Wieder wurde zentrifugiert (4°C, 2000 rpm). Aus dem Zellbrei wurden zur Probe 2 µl entnommen und 1 : 500 mit 10 %iger Glycerinlösung verdünnt. Die OD_{600nm} sollte ca. 0,4 betragen. Der Zellbrei wurde in ein Falconröhrchen übertragen. Mit 50 %iger Glycerinlösung wurde eine Endglycerinkonzentration von 20 % eingestellt.

2.6.1.4 Transformation von Bakterien

Transformation chemisch kompetenter E.coli

Die zu amplifizierende DNA wurde mit 100 µl *E. coli*-Zell-Suspension vermischt und 30 min auf Eis in Polypropylen-Reaktionsgefäßen (17 x 100 mm) inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s in einem Wasserbad wurde der Ansatz 5 min auf Eis gestellt. SOC-Medium (500 µl, 37°C) wurde hinzugegeben. Es folgte eine 60-minütige Inkubation in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C. Anschließend wurden 200 µl der Lösung auf LB-Petrischalen mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert, gewendet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Screenen wurde mit Einzelklonen für die folgende Minipreparation eine 1,5 ml Flüssigkultur angeimpft oder zusätzlich für einen Kolonie-Blot umplattiert.

Transformation elektrokompenter E.coli

Die Elektroporation ist das effizienteste Transformationsverfahren. Die DNA-Lösung muss dafür allerdings möglichst salzfrei sein. Der Elektroporator appliziert einen Spannungspuls von 1800 V. Die Pulszeit gibt Auskunft über den Erfolg der Poration und sollte bei ca. 5 ms liegen. Sofort nach dem Auftauen auf Eis wurden 25 µl - 50 µl der elektrokompenten *E. coli* mit 1 µl salzfreier DNA-Lösung vermischt und in eine vorgekühlte sterile Elektroporations-Küvette gegeben. Nach erfolgtem Spannungspuls wurden mit 500 µl 37°C warmes SOC-Medium die Zellen aufgenommen und in einem Polypropylen-Reaktionsgefäß (17 x 100 mm) für 60 min bei 37°C und 225 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Das Ausplattieren und die weitere Behandlung erfolgte wie bei den chemisch kompetenten Zellen.

2.6.1.5 Screening von Bakterienkolonien auf Plasmide

Zum Screenen amplifizierter DNA wurden drei Verfahren eingesetzt: das Blau-weiß-screening, die Restriktionsanalyse und der Kolonie-Blot.

2.6.1.5.1 Blau-weiß-screening

Mit dieser Methode können Klone, die mit dem Bluescript-Plasmid transformiert wurden, detektiert werden. Die Polylinkersequenz des Vektors liegt inmitten einer β -Galaktosidase-kodierenden Sequenz (*lacZ*), so dass die Einklonierung von DNA zu einer Ausschaltung des *lacZ*-Gens führt. Positive Klone, die auf einem IPTG (Isopropyl 1-Thio- β -D-Galaktosidase)- und laktosehaltigem Kulturmedium gewachsen sind, zeigen einen weissen Phänotyp, während negative blau erscheinen. So konnte die Zahl der zu untersuchenden Klone eingeschränkt werden.

2.6.1.5.2 Restriktionsanalyse

Nach Präparation der DNA aus den Klonen im Eppendorf-Maßstab werden diese durch Restriktionsverdau getestet. Durch die spezifischen Verdau entstehen linearisierte Fragmente definierter Größe, die in einem Agarosegel aufgetrennt und anhand eines Größenmarkers bestimmt werden können. Mit dieser Methode wurden bis zu 30 Klone gleichzeitig getestet.

2.6.1.5.3 Kolonie-Blot

Eine andere Methode für die Analyse von Klonen ist der Kolonie-Blot. Bei diesem Verfahren wird die DNA in den Klonen über eine spezifische DNA-Sonde detektiert. Mit dieser aufwendigeren Methode konnten bis zu 300 Klone zeitgleich untersucht werden. Es wurde das „DIG-System for Filter Hybridization“ (Roche) verwendet.

Zuerst wurde eine DNA Sonde am 3'-Ende mit Digoxigenin-11-didesoxy-UTP (DIG-ddUTP) unter Benutzung des DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit von Roche markiert. Dabei wurde DIG-ddUTP über die terminale Transferase (50 units/ μ l, 15 min, 37°C) an das „*antisense*“ Oligonukleotid der gesuchten spezifischen DNA-Sequenz gebunden. Die transformierten Kolonien wurden von der über Nacht kultivierten LB-Agarplatte gepickt und auf neue LB-Platten mit hinterlegtem Raster übertragen, wobei jeder Kolonie ein nummeriertes Feld zugeordnet wurde. Nach erneuter Inkubation (16 h, 37°C) wurde die *HybondTM-N⁺* -Nitrozellulosemembran auf die Kolonien gelegt, unverkennbar markiert und vorsichtig wieder abgezogen. Dieser Abklatsch wurde in

den folgenden Schritten denaturiert und lysiert. Durch Bestrahlung in einem UV-Crosslinker wurde die in den Bakterien enthaltene DNA an die Nitrozellulosemembran gebunden. Im anschließenden Hybridisationschritt lagerte sich die DIG-markierte DNA-Sonde bei erfolgreicher Transformation an die gesuchte Sequenz an. Über einen Anti-Digoxigenin Antikörper, gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase, erfolgte die Detektion über eine Chemilumineszenzreaktion (siehe auch: *The DIG-System User's Guide for Filter Hybridization*).

2.6.1.6 DNA-Präparation im Eppendorf- und semiquantitativen Maßstab

Isolation im Eppendorf-Maßstab (8)

Mit diesem Verfahren wurde DNA aus transformierten Bakterienklonen isoliert. Dazu wurden mit den gepickten Klonen erst 1,5 ml Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 300 rpm). Diese Vorkulturen wurden dann bei 4000 g und RT für 5 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit 100 µl P1 durch Vortexierung resuspendiert und sofort mit 200 µl P2 lysiert. Nach 3 min auf Eis wurde das Zellmaterial mit 150 µl 4°C kaltem P3 gefällt und durch Zentrifugation (13000 g, 4°C, 30 min) abgetrennt. Der Überstand wurde mit dem 0,6 -fachen Volumen Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer, Aqua_{bidest} oder EB-Puffer resuspendiert.

Eingesetzte Puffer :

P1:	50 mM Glukose 25 mM Tris, pH 8 10 mM EDTA	P2:	0,2 N NaOH 1 % SDS	P3:	3 M KAc, pH 5,5
------------	-------------------------------------------------	------------	-----------------------	------------	-----------------

TE-Puffer:	10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA pH 8,0	EB-Puffer:	10 mM Tris-Cl pH 8,0
-------------------	--------------------------------------	-------------------	-------------------------

Semiquantitative Plasmid Isolation (41)

Um größere Mengen DNA (bis zu 1 g) zu amplifizieren, wurde ein Kit-System von Qiagen verwendet (siehe auch Qiagen Plasmid Midi Kit Protokoll). Mit einer 1,5 ml Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 300 rpm). Nach dem Pelletieren der Bakterien (15min, 4°C, Centrikon H-401 Zentrifuge,

A824-Rotor, 4000 rpm, ~ 6000 g) wurden sie in 4 ml P1 plus RNase A resuspendiert und vortexiert. 4 ml P2 wurden hinzugegeben, vorsichtig gemischt, der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml eiskaltem P3 wurde das Lysat in eine Filterpatrone gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Zur DNA-Bindung wurde eine andere Filterpatrone mit P „QBT“ equilibriert, worauf das Lysat nach Filtration gegeben wurde. Die gebundene DNA wurde über 2 Waschschrte mit je 10 ml P „QC“ gereinigt und dann mit 5 ml P „QF“ eluiert. Zur Präzipitation wurden 0,7 Volumen Isopropanol (RT), hinzugegeben, gemixt und zentrifugiert (15000 g, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet wurde gewaschen und in TE-Puffer oder EB gelöst.

2.6.2 Verwendung von Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung in Vektoren, Verändern und Analysieren von DNA wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Sie erkennen kurze, palindromische DNA-Sequenzen und schneiden den DNA-Doppelstrang an spezifischen Schnittstellen. Ein Verdauungsansatz wurde nach den Angaben des Enzymherstellers (New England Biolabs) wie folgt zusammengesetzt:

- die DNA-Lösung in Wasser oder TE-Puffer
- 10 x Restriktionsendonukleasenpuffer in einfacher Endkonzentration
- je nach Enzym eventuell 10 x BSA in einfacher Endkonzentration
- 1 – 5 U/µg DNA Restriktionsendonuklease
- Aqua_{bidest} zum Einstellen des Endvolumens (die Enzyme sind in 50 % Glycerin suspendiert, die Gesamtglycerinkonzentration sollte unter 5 % bleiben)

Die Restriktionsendonuklease wurde zum Schluss hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei einer für das Enzym optimalen Temperatur in einem Wasserbad bis zu 16h inkubiert. Es konnten auch mehrere Restriktionsendonukleasen gleichzeitig in einem Ansatz verwendet werden, wenn die Temperatur- und Pufferbedingungen übereinstimmten. Die Effizienz des Verdauens hängt vor allem auch von der Sauberkeit der eingesetzten DNA-Lösung ab. Ein besseres Ergebnis konnte daher durch mehr Enzym (bis zu 20 U/µg DNA) und ein größeres Endvolumen (Verdünnung der Kontaminationen) erzielt werden. Tab. 2.2 zeigt die verwendeten Restriktionsendonukleasen mit den entsprechenden Puffern (New England Biolabs), die mit und ohne Zusatz von BSA (bovinem Serumalbumin) eingesetzt wurden.

Restriktions- endonuklease	Puffer m/o BSA	Enzymaktivität im Puffer (1-4) in %			
		1	2	3	4
Aat II	4	0	50	50	100
Acc I	4	50	50	10	100
Afl II	2 + BSA	50	100	25	100
Age I (25°C)	1	100	100	100	75
BamH I	U + BSA	75	100	50	75
Bgl II	3	10	75	100	10
EcoR I	U	100	100	100	100
Hind III	2	50	100	10	50
Kpn I	1 + BSA	100	75	0	50
Nhe I	2 + BSA	100	100	10	100
Not I	3 + BSA	0	75	100	50
Cla I	4 + BSA	10	50	50	100
Sac I	1 + BSA	100	50	10	100
Sal I	U + BSA	0	0	50	0
Spe I	2 + BSA	75	100	25	75
Stu I	2	100	100	50	100
Taq I (65°C)	U + BSA	50	75	75	75
Xba I	2 + BSA	0	100	75	75
Xho I	2 + BSA	75	100	100	100
Xma I	4	100	100	0	100

Tab. 2.2:

Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer

2.6.3 Auftrennung der DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese

DNA ist aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen und bewegt sich daher im elektrischen Feld zur Anode. Bei linear vorliegender DNA ist das Verhältnis von Länge zur Ladung immer gleich. Die Länge des Fragmentes bestimmt somit die Wandergeschwindigkeit in der Gelmatrix. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller, da die Struktur des Agarosegels für sie durchlässiger ist. Dementsprechend bewegen sich größere Fragmente langsamer durch die Gelmatrix. So kann linearisierte DNA nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Die Konzentration der Agarose im Gel bestimmt die absolute Wandergeschwindigkeit. In einem hoch konzentrierten Gel bewegt sich ein DNA-Fragment langsamer als in einem niedrig konzentrierten Gel. Daher werden höher konzentrierte Gele für die Trennung kleinerer Fragmente bevorzugt, während die Trennung großer Fragmente besser in niedriger konzentrierten Gelen gelingt. Ethidiumbromid, das schon im Gel ist oder nach dem Lauf hinzugegeben werden kann, interkaliert mit der DNA, die so unter einer UV-Lampe durch rote Fluoreszenz sichtbar wird.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde ein entsprechend konzentriertes Agarosegel hergestellt:

Agarosekonzentration (in %)	Auftrennungsvermögen linearisierter DNA-Fragmente (in Kilobasen)
0,5	30 – 1
0,7	12 – 0,8
1,0	10 – 0,5
1,2	7 – 0,4
1,5	3 – 0,2

Dazu wurde Agarose in 0,5 x TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung klar wurde. Ethidiumbromid (1 µg/ml) wurde zugefügt. War das Gemisch auf ca. 60°C abgekühlt, wurde es in eine Gießform mit eingesetztem Kamm für die DNA-Proben gekippt. Nach dem Aushärten konnte es in die Elektrophoresekammer gelegt werden, wo es mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet wurde. Die DNA-Lösung wurde mit dem 10 x Probenpuffer vermischt, so dass dieser in einfacher Endkonzentration vorlag, und in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 8 V/cm Gellänge von 30 min bis zu 3 h. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente diente ein Standard-DNA-Größenmarker.

10 X TBE-Puffer

109 g Tris

55 g Borsäure

9,3 g EDTA

10 X DNA-Probenpuffer

50 % Glycerin

0,8 % Bromphenolblau

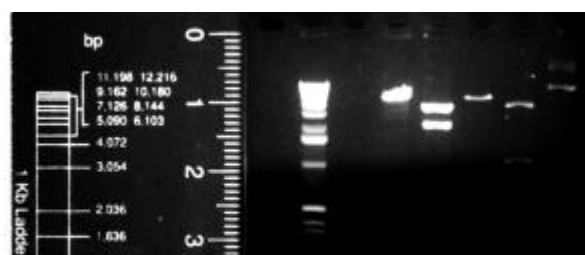
in 10 X TBE-Puffer

Ethidiumbromid

Stammlösung: 5 mg/ml in

H₂O_{bidest}**Abb. 2.9:**

Aufgetrennte linearisierte DNA nach Agarosegelelektrophorese.



2.6.4 Eluierung der DNA aus einem Agarosegel

Nach der Auftrennung wurden die gesuchten Ethidium-Bromid-markierten Fragmente mit einem sauberen Skalpell unter UV-Sicht aus dem Gel ausgeschnitten. Zur weiteren Präparation wurde ein Kit-System von Quiagen benutzt. Alternativ konnte der Agaroseausschnitt durch autoklavierte Filterwatte zentrifugiert und anschließend mit Phenolchloroform extrahiert werden.

2.6.5 Phenolextraktion der DNA

Phenolchloroform denaturiert und löst Proteine. An die DNA lagert sich das Natriumazetat an, so dass die DNA-Salz-Verbindung in 100 % Ethanol ausfällt. Das Salz wird durch Waschen mit 70 % Ethanol wieder entfernt.

Nach diesem Prinzip wurde zu der DNA-Lösung das gleiche Volumen Phenolchloroform gegeben und gemixt, wodurch vorhandenes Protein denaturiert, gelöst und durch folgende Zentrifugation (20 min, 13000 g, RT) abgetrennt wurde. Die obere Wasserphase mit der DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß umpipettiert. Das gleiche Volumen Chloroform-isoamyl-alkohol wurde dazu gegeben und bei RT für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte einkonzentriert werden.

2.6.6 Präzipitation der DNA

Zur Präzipitation wurde zur DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat gegeben. (1 µl Glykogen konnte als Fällungshilfe dienen.) Nach kurzem Vortexieren, wurde das 3 x Volumen 100 % eiskaltes Ethanol hinzugegeben, gemixt und bei 13000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 4°C, 13000 g) und nach dem Trocknen in einem kleinen Volumen TE-Puffer oder Aqua_{bidest} resuspendiert. Alternativ konnte auch mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt werden.

2.6.7 Dephosphorylierung

Wird ein Vektor so verdaut, dass seine Enden zueinander komplementär sind (oder auch nur teilweise), kann er bei folgender Ligation auch ohne den Einbau der Insert-DNA rezirkulieren. Um die Rate dieser falsch positiven Klone bei der folgenden Transformation zu senken, wurde der Vektor vor der Ligation dephosphoryliert. Wir benutz-

ten dazu eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm („Calf Intestine Phosphatase“) von Biolabs. Sie dephosphoryliert den 5'-Terminus. Für die Reaktion wurde 1U CIP / 2 pmol DNA in 1 x CIP-Puffer für 15 min bei 37°C eingesetzt. Nach erneuter Zugabe von 1U CIP wurde die Lösung für 15 min bei 56°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen bei 70°C gestoppt. Nach PCI Extraktion konnte der Ansatz gefällt werden.

2.6.8 Herstellung von „blunt ends“ mit der Klenow-Methode

Komplementäre Schnittstellen lassen sich herstellen, indem man überhängende Enden des DNA-Doppelstrangs zu glatten Enden auffüllt. Hierzu wurde die Klenow Polymerase verwendet. Sie füllt 5' Enden auf. Dazu wurden 1-10 µg DNA mit 10 x Klenow Puffer durch Zusatz von 1 µl 0,5 mM dNTPs und 1-5 U Klenow Enzym, in 30 µl Gesamtvolumen, für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch Hitze (75°C) für 10 min und anschließende PCI-Extraktion.

2.6.9 Ligation der DNA

Ligasen fügen komplementäre DNA-Doppelstränge zusammen. Verwendet wurde das Rapid-DNA-Ligation-Kit von Boehringer, Mannheim.

Ein Ligationsansatz enthielt:

- 10 µl der zu ligierenden DNA-Fragmente in 1 x DNA-Verdünnungspuffer (das molare Verhältnis von Insert : Vektor wurde 3 : 1 eingestellt und nicht mehr als 200 ng DNA wurden insgesamt eingesetzt)
- 10 µl T4-DNA-Ligationspuffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase (5U)

Vor und nach Zugabe der Ligase wurde der Ansatz kurz gemischt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 5 min. Für die folgende Transformation des ligierten Plasmids wurde der Ansatz mit PCI extrahiert, präzipitiert und gewaschen.

2.6.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Lösung im Verhältnis 1 : 100 in Aqua_{bidest} verdünnt und bei 260 nm und 280 nm gegen den Leerwert gemessen. Aus der optischen Dichte der Lösung wurde nach der Formel:

„ $OD_{260nm} \times 5 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$ “ die DNA-Konzentration berechnet. Der Quotient OD_{260nm} / OD_{280nm} gibt Auskunft über die Reinheit der gemessenen DNA. Werte unter 1,7 und über 2,0 zeigen Verunreinigungen mit Protein an.

2.6.11 Einfügen von Punktmutationen über PCR

Zum Erstellen einer Punktmutation in einer klonierten DNA Sequenz wurde das QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet (für Details siehe Produktbeschreibung zum Kit bei Stratagene).

Mit der im Vektor einklonierten DNA, die eine Punktmutation erhalten sollte, wurde eine PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer (ca. 14 Codons) binden komplementär an den „sense“ und den „antisense“-Strang der Plasmid DNA. In der Mitte der Primer befindet sich die vorgesehene Mutation. Durch die Pfu Turbo DNA Polymerase wurden die Primer während einer PCR zu Plasmiden mit den entsprechenden Punktmutationen vervollständigt und amplifiziert. Die nicht mutierte DNA, die als Matrize dient, ist nicht methyliert und kann somit durch einen Restriktionsenzymverdau beseitigt werden. Das nun rein vorliegende punktmutierte Plasmid konnte über Bakterientransformation amplifiziert werden.

2.7 Proteinanalyse

2.7.1 Zelloberflächenbiotinylierung (33;66)

Biotin bindet über Schwefelbrücken an Proteine. Auf diese Weise markierte Proteine können über eine zweite Biotin-Streptavidin-Bindung präzipitiert werden. Dieses Verfahren wurde zur biochemischen Analyse der Proteinlokalisierung verwendet. Zellen, die auf Filtern gewachsen sind, lassen sich selektiv von der apikalen und basolateralen Seite biotinylieren. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C, die Zellen waren immer auf

Eis. Alle verwendeten Lösungen wurden vorher durch Filtration (0,2 µm Porengröße) sterilisiert.

Biotinlösung	Triton-Lösung	Quenching-Lösung
Biotinylierungspuffer	Lysis-Puffer	(pH 7,2 - 7,4)
+ 7,5 µl Biotin /ml	+ 2µl/ml	PBS ⁺⁺
(Stock: 200 mg/ml)	Proteinaseinhibitoren	+ 100 mM Glycine
Biotinylierungspuffer	Lysis-Puffer	High-Salt-Waschpuffer
(pH: 9,0)	(pH: 7,5)	(pH: 7,5)
10 mM Triethanolamine	1 % Tritonx100	0,1 % Tritonx100
2 mM CaCl ₂	150 mM NaCl	500 mM NaCl
150 mM NaCl	5 mM EDTA	5 mM EDTA
ad Ampuwa 50 ml	50 mM Tris	50 mM Tris
	ad Ampuwa 50 ml	
No-Salt-Waschpuffer		
(pH: 7,5)		
10 mM Tris		
ad Aqua _{bidest}		

Auf 24 mm Polycarbonatfilter (Costar) wurden je 200000 Zellen ausgesät. Nach 7 Tagen Wachstum war der Zellayer dicht und die Zellen auspolarisiert. Die Zellen wurden 2-mal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen, Biotin wurde von apikal oder basolateral für 30 min gegeben (nur Biotinylierungspuffer wurde auf die Gegenseite gegeben). Dann wurde 2-mal mit Glycinpuffer gewaschen und durch 15-minütige Inkubation in Glycinpuffer gequencht. Nach 4-maligem Waschen in PBS⁺⁺ wurden die Filter ausgeschnitten, gewendet und 1h in 1 ml Tritonlösung solubilisiert. Die Zellen konnten danach mit einem Schaber abgekratzt werden. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mehrfach durch eine 1ml-Spritze gedrückt, um durch die Scherkräfte alle Zellen aufzuschließen. Nach dem Pelletieren der Zelltrümmer (13000 rpm, 5 min, 4°C), wurde der Überstand mit 100 µl Streptavidin versetzt und bei 4°C für 16 h auf einem Rollenmixer inkubiert. Das jetzt an Streptavidin gebundene und so beschwerte Protein konnte durch Zentrifugation (13000 rpm, 3 min, 4°C) aus der Lösung getrennt werden. Das Proteinpellet wurde in 6 Schritten aufgereinigt:

- 3x mit Lysis Puffer (Zentrifugieren bei 13000 rpm, 3 min, 4°C)
- 2x mit High Salt (Zentrifugieren bei 13000 rpm, 3 min, 4°C)
- 1x mit No Salt (Zentrifugieren bei 13000 rpm, 5 min, 4°C)

Das nun saubere Pellet wurde mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 3 min, RT) wurde der Überstand mit dem Protein abgenommen, direkt weiterverwendet oder bei –70°C eingefroren.

2.7.2 Proteinbestimmung mit der Amido-Schwarz-Methode (23)

Die Methode erlaubt Proteinbestimmungen im Bereich von etwa 1,25 µg/10 µl bis etwa 40 µg/10 µl. Dementsprechend wurden folgende Standards verwendet: 1,25, 2,5, 5,0, 10, 20 und 40 µg Protein /10 µl Probenpuffer. Standards (BSA) sind kommerziell erhältlich und wurden in 1 X SDS-Proben-Puffer gelöst (Sigma Katalog Nr.: P 7656). Die CA-Folie wurde mit Bleistift in Felder (1 cm) aufgeteilt, auf die Standards, Proben und Leerwert (10 µl) jeweils in Doppelbestimmungen aufgetragen wurden. Als Leerwert diente nur Puffer. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Folie 10 min lang mit einem Fön getrocknet, 10 min unter Schütteln in Färbelösung gelegt, 3 x 5 min in Entfärbelösung entfärbt und wieder 10 min getrocknet. Die Felder wurden ausgeschnitten und in 1 ml Auflöselösung gegeben. Nach 30 min Erhitzung (50°C) wurden die Proben gevortext bis die Lösungen homogen waren. 200 µl aus jeder Probe wurden in eine 96-well Platte gefüllt und bei 650 nm in einem Reader (Molecular Devices) gegen den Leerwert gemessen.

Über die Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben nach folgender Formel berechnet:

$y = A+B*x$ (x = Proteinkonzentration, A = y-Achsenabschnitt, B = Steigung der Standardkurve, y = OD der Probe)

Färbelösung	Entfärbelösung	Auflöselösung
0,5 % _g Amidoschwarz	47,5 % Methanol	80 % Ameisensäure
45 % Methanol	47,5 % Aqua _{bidest}	10 % Eisessig
45 % Aqua _{bidest}	5 % Eisessig	5 g TCA /100 ml
10 % Eisessig		ad Aqua _{bidest}

2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS ist ein anionisches Detergenz mit einer starken Affinität zu Proteinen. Die Proteine werden durch SDS denaturiert und erhalten proportional zu ihrer Molekülmasse negative Ladungen. Im elektrischen Feld wandern sie daher zur Anode werden und werden im Gel entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Verwendete Substanzen:

Roti-Gel-A:	Rotiphorese Gel A, 30 % Acrylamid
Roti-Gel-B:	Rotiphorese Gel B, 2 % Bisacrylamid
1,5 M Tris/SDS:	1,5 M Tris, 0,5 % Sodiumdodecylsulfat, H ₂ O _{bidest.} , pH 8,8
0,5 M Tris/SDS:	0,5 M Tris, 0,5 % Sodiumdodecylsulfat, H ₂ O _{bidest.} , pH 6,8
APS:	10 % Ammoniumperoxidsulfat
Temed:	Tetraethymethyldiamin (Lagerung bei 4°C)
Laufpuffer:	1.0 g SDS, 14.4 g Glycin, 3 g Tris, auf 1l ad Aqua _{bidest}
Transferpuffer:	47,9 mM Trisbase, 38,9 mM Glycine, 0,038 % SDS, 20 % MEOH in Aqua _{bidest}
Block-Lösung:	5 % Milchpulver in 0.05 % Tween in PBS ⁻

Proteine wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zuerst wurde ein 7,5 % Trenngel hergestellt, das nach Aushärtung mit dem Sammelgel für den Probeneinlauf überschichtet wurde.

Trenngel (7,5 %)		Sammelgel (5 %)	
Aqua _{bidest}	1,822 ml	Aqua _{bidest}	1,3 ml
Roti-Gel-A	1,215 ml	Roti-Gel-A	375 µl
Roti-Gel-B	0,503 ml	Roti-Gel-B	150 µl
1,5 M Tris/SDS	1,3 ml	0,5 M Tris/SDS	0,5 ml
APS	25 µl	APS	25 µl
Temed	3,75 µl	Temed	2,5 µl

Der Einlauf der Proben erfolgte mit 80 V für 10 min, die Auftrennung mit 100 V für ca. 2 h. Es wurde die Elektrophoresekammer „BIORAD Mini-2D-Cell“ verwendet.

2.7.4 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proben wurde das Gel auf Nitrozellulose geblottet (0,8 mA/m², 50 min). Der Western Blot erfolgte nach dem ECL-Schema (Amersham Pharmacia).

Die Nitrozellulose mit dem aufgeblotteten Protein wurde für 1h bei RT in ca 10 ml Block-Lösung inkubiert, in PBS⁻ mit Tween gewaschen (1x15 min, dann 2x5 min), in Folie eingeschweißt und der Erstantikörper wurde hinzugegeben (Inkubation bei 4°C über Nacht). Anschließend wurde der Blot gewaschen (1x15 min, dann 2x5 min in PBS+Tween) und mit dem Zweitantikörper (Horse-Radish-Peroxidase-gelabelt) inkubiert (2h, RT). Nach weiteren Waschschritten (1x15 min, dann 4x5 min in PBS⁻+Tween) erfolgte die Detektion. Dazu wurde der Blot in Saran-Folie eingebettet und das Detektionsreagenzgemisch für 1 min hinzugegeben. Nach Umbettung in neue Folie wurde der Blot dem Film in einer geschlossenen Kassette für 10-30 min exponiert. Nach Entwicklung (1-2 min), Fixierung (10 min) und Wässerung (30 min) wurde der fertige Film getrocknet.

2.7.5 Immunfluoreszenz

Die Präparate (Zellen auf Filter oder beschichtetem Glas) wurden zuerst in PBS⁺⁺ gewaschen, um restliches Medium und tote Zellen zu entfernen. Dann wurden sie mit Methanol (100 %, -20°C, 7 min) oder Paraformaldehyd (4 % in PBS⁺⁺, 4°C, 30 min) fixiert. Anschließend wurden sie 4-mal in PBS⁺⁺ gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation in GSDB-Puffer (permeabilisiert die Zellen) oder verschiedenen Seren (Humanes-, Ziegen-, Bovines- Serum ohne Triton) geblockt (1 h, RT). Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (2-3 h bei RT, oder über Nacht bei 4°C, verdünnt in Blocklösung). Nicht gebundener AK wurde durch 3-maliges Waschen in PBS⁺⁺ entfernt. Dann wurden die Präparate mit dem Zweitantikörper inkubiert (2-3 h bei RT). Nach erneutem Waschen (2-mal in PBS⁺⁺) wurden die Präparate mit Mowiol + 50 µg DABCO (1,4 Diazabicyclo-octane) / ml eingedeckelt und bis zur Aushärtung lichtgeschützt bei 8°C gelagert.

GSDB-Puffer (2x): 100 ml Goat Serum; 50 ml 240 mM NaPO₄ (pH 7,4);
54 ml 5 M NaCl; 94,2 ml H₂O; 1,8 ml Tx100 (Triton);
ad 300 ml Aqua_{dest}

Für Western Blot und Immunfluoreszenz wurden die in Tab. 2.3 aufgeführten Antikörper verwendet.

Erstantikörper	Wirt	Konzentration		Referenz
		W.B.	I.F.	
gHK- α (HK-9)	Kaninchen	1:250	1:100	M. Caplan, New Haven
gHK- β	Maus	1:2000	1:500-1000	Sigma, Deutschland
Na/K- β (Serum 13)	Maus	1:100	1:100	M. Caplan
Na/K- α 1 (6H)	Maus	1:250	1:100	M. Caplan
Tubulin- α	Maus	1:500-1000	1:250	Sigma
ATP1A1	Kaninchen	1:250-500	1:100-400	M. Caplan, J. Reinhardt
Zweitantikörper				
FITC-Anti-Maus	Ziege		1:100	Sigma
FITC-Anti-Kaninchen	Ziege		1:100	Sigma
TRITC-Anti-Maus	Ziege		1:100	Sigma
TRITC-Anti-Kaninchen	Ziege		1:100	Sigma
Anti-Maus, Anti-Kaninchen HRP-gelabelt	Ziege	1:1000		Amersham Pharmacia, England

Tab. 2.3:

Antikörper für Western Blot (W.B.) und Immunfluoreszenz (I.F.)

2.7.6 Mikroskopie

Geräte:

Digitalkamera (Cool Snap HQ)	Visitron Systems
Konfokalmikroskop, IX 70	Olympus
Laser für Konfokalmikroskop	Omnichrome
Mikroskop für Digitalkamera (Cool Snap HQ)	Axiovert S100, Zeiss

Konfokale-Laser-Mikroskopie

Mit der konfokalen Lasermikroskopie können Bilder in verschiedenen Schnittebenen (xy, xz) generiert werden. Über den Laser wird mit einem definierten Wellenlängenbereich die Fluoreszenz des Zweit-Antikörpers angeregt. Dieser emittiert dann Licht in einem spezifischen, niedrigeren Wellenlängenbereich. Der Detektor wird so eingestellt, dass er dann nur dieses Spektrum registriert. Der Brennpunkt des Laserlichts bestimmt die Schnittebene. Streulicht wird herausgefiltert. Xz-Schnitte entstehen durch Über-

lagerung von Xy-Schnitten. Die Höheneinstellung wird über einen Motor reguliert, der die Ebenen mit einer Auflösung bis 0,2 µm einstellen kann.

Wellenlängen	FITC	TRITC	GFP
Mittlere Anregung	450 nm (blau)	540 nm (grün)	488 nm (blau)
Mittlere Emission	525 nm (grün)	570 nm (rot)	520 nm (grün)

Tab. 2.4:

Spektrum der Fluorochrome

CCD-Kamera-Mikroskopie

Die CCD-Kamera kann durch Veränderung der Belichtungszeit auch noch sehr schwache Signale detektieren. Die Anregung erfolgt über eine Quecksilberlampe, deren Emissionsspektrum durch Nachschalten eines Filters begrenzt wird. Definierte Schnittbilder sind nicht möglich, doch ist die Auflösung deutlich besser als bei der Konfokalmikroskopie. Durch die exzellente Signalverstärkung über die Belichtungszeit sind kurze Expositionszeiten ausreichend. Dadurch lassen sich phototoxische Effekte minimieren, was diese Mikroskopie für lebende Zellen interessant macht.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien

Einwegplastikmaterialien
 Falcon Multiwell™ (6, 12, 24 Well)
 Kryoröhrchen
 Lab-Tek
 Polycarbonat-Transwell-Filter (12 und 24mm)
 Sterilfilter (0,2µm Porendurchmesser)
 Zellkulturflaschen (T25, T75), Zellkulturschalen

Sarstedt, Nümbrecht
 Becton Dickinson, USA
 Nunc International, USA
 Nunc International, USA
 Costar, Corning USA
 Schleicher + Schull, Dassel
 Becton Dickinson, USA

Geräte

Mikroskop, invers	Axiovert 25, Zeiss
Neubauer Zählkammer	Brandt
Personenschutzbank "Microflow"	Nunc, Wiesbaden
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Julabo
Zellinkubator	Heraeus, Hanau
Zellzentrifuge, Labofuge M	Heraeus, Hanau

2.8.2 Die MDCK-Zelllinie

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um MDCK-Zellen. Diese Linie stammt aus dem Tubulussystem der Nieren eines Cockerspaniels und ist von Madin und Darby 1958 isoliert worden. Sie sind bei ATCC (American Type Culture Collection, Manasses, VA, USA) erhältlich.

2.8.3 Nährmedien, Zusätze und Puffer**Zellkulturmedium**

MEM-Earle-1x (minimal essentielles Medium, nach Earle gepuffert, PAA, Österreich)

- + 10 % FKS (fetales Kälberserum; Biochrom AG)
- + 100 µg/ml (=100 U/ml) Penicillin
- + 100 µg/ml (=100 U/ml) Streptomycin
- + evtl. Selektionsantibiotikum (je nach Plasmid: 2 µg/ml Hygromycin B u.o. 0,5 µg/ml Geneticin 418)

Kultur-Antibiotika

Penicillin, Streptomycin (Biochrom AG)

Selektions-Antibiotika

Hygromycin B (Invitrogen)
Geneticin 418 (Gibco)

PBS⁻, 1x (Biochrom AG, Berlin)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂PO₄·7H₂O
1,4 mM KH₂PO₄

PBS⁺⁺, 1x (Biochrom AG, Berlin)

PBS⁻
+ 1mM MgCl
+ 0,1 mM CaCl

EDTA-Puffer, 1x

0,53 mM EDTA
274 mM NaCl
5 mM KCl
15 mM NaH₂PO₄
3 mM KH₂PO₄

Hepes-Puffer, 1x

10 mM Hepes
5,5 mM Glukose
122 mM NaCl
5 mM KCl
0,8 mM MgCl
1,8 mM CaCl
1 mM NaH₂PO₄

2.8.4 Kulturbedingungen

MDCK-Wildtyp-Zellen wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage, vor Experimenten täglich. Die Zellen wurden alle 5 Tage passagiert.

2.8.5 Stimulation der Proteinexpression mit Natriumbutyrat

Der CMV-Promotor der eingesetzten Plasmide wurde über einen Natriumbutyrat-Stimulus (10 mM, 12 h) angeregt.

2.8.6 Splitten und Aussähen von Zellen

Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS⁻ oder mit EDTA-Puffer gespült, um das Kalzium und im Serum enthaltene Proteaseinhibitoren zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml/ 75 cm² Trypsin (0,05 % in 0,02 % EDTA, Biochrom AG) auf die Zellen gegeben. Die abgelöste Zellsuspension wurde mit frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in einem neuen Kulturgefäß ausgesät oder eingefroren.

2.8.7 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Zur Präzipitation der gelösten Zellen wurde die Zellsuspension zentrifugiert (900 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde mit Einfriermedium (4°C) aufgenommen und in vorgekühlte Kryoröhrchen (1,8 ml) gefüllt. Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen bei -80°C eingefroren.

Einfriermedium: 20 % FKS, 10 % DMSO, 70 % MEM-Earle-1x

2.8.8 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Zellsuspension wurde in den Raum zwischen Kammer und Deckglas gegeben. Der Mittelwert aus vier Quadranten, multipliziert mit 10000 entspricht der Zellzahl pro ml.

2.8.9 Beschichtung von Glas-Oberflächen

Die Reinigung des Glases war bei allen Beschichtungsformen gleich. Glas wurde mit 70 % Ethanol abgewischt und anschließend 2 Stunden in 70 % Ethanol eingelegt, mit Aqua bidest. gespült, getrocknet und sterilisiert.

Gelatinebeschichtung:

Nach 2 x Spülen mit PBS⁻ oder Ampuwa wurde das sterilisierte Glas getrocknet und mit 0,5 % Gelatine beschichtet (1 h, 37°C). Nach Absaugen der Gelatine wurde durch Überschichten mit 2 % Glutaraldehyd quervernetzt (30 min, 37°C). Überschüssiges Glutaraldehyd wurde abgesaugt, das Glas wurde mit 70 % Ethanol überschichtet, das nach einer Stunde gewechselt wurde. In Ethanol konnten die Glasoberflächen mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Vor Gebrauch wurde das Glas 2 x mit PBS⁺⁺ gewaschen.

Poly-L-Lysin-Beschichtung:

Nach Reinigung und Sterilisierung wurde Glas mit Poly-L-Lysin beschichtet (30 min, 37°C) und anschließend zum sofortigen Gebrauch 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen.

Kollagen-Beschichtung:

Nach Reinigung und Sterilisierung wurde Glas 12 h bei RT mit Kollagen Typ IV beschichtet. Nach Lufttrocknung wurden die beschichteten Gläser sofort verwendet oder im Brutschrank (100 % Luftfeuchtigkeit) gelagert.

2.8.10 stabile Transfektion von MDCK-Zellen

Von allen Klonen wurden mit folgenden Verfahren stabil exprimierende Zelllinien hergestellt:

2.8.10.1 Einzel- und Doppel-Transfektion mit DOTAP

Zur Transfektion der Kulturzellen wurde das liposomale Reagenz DOTAP (Roche, Mannheim) verwendet. Die zu transfizierende DNA wurde aufgereinigt und in TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration sollte ca 1 µg/µl betragen.

Die DNA-Lösung wurde mit HEPES-Puffer auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl zu einem Gesamtvolumen von 75 µl verdünnt. 45 µl DOTAP wurden mit HEPES auf 140 µl aufgefüllt. (*es sollten 5 – 10 µg DOTAP pro µg DNA eingesetzt werden*) Die DNA-Lösung wurde zu der DOTAP-Lösung hinzugegeben, vorsichtig gemischt und dann für 15 min bei RT inkubiert. Die inkubierte Lösung wurde in 10 ml Medium ohne Selektionsantibiotikum gegeben und wieder vorsichtig gemischt (die DOTAP-Konzentration sollte nicht über 30µg/ml Medium sein).

Die MDCK-WT-Zellen waren auf 10er Petrischalen so dicht gewachsen (ca. 60 % Dichte), dass sie binnen eines weiteren Tages Inkubation konfluent wurden.

Die Zellen wurden mit PBS⁺⁺ gewaschen. Das Transfektionsmedium wurde hinzugegeben. Nach 18h Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium von den Zellen abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS⁺⁺ gewaschen, Selektionsmedium wurde hinzugegeben. Nach etwa 10 Tagen hatten sich nach erfolgreicher Transfektion resistente Kolonien gebildet.

2.8.10.2 Selektion transfizierter Zellen

Funktionelle Selektion mit Ouabain

Zur Selektionierung der ATP1A1 exprimierenden Zellen wurde Ouabain (0,5 – 1 µM) dem Medium für 3 Tage hinzugegeben, um die endogene Na⁺,K⁺-ATPase zu blockieren. Zellen, welche die transfizierte nicht gastrische H⁺,K⁺-ATPase exprimieren, haben einen Selektionsvorteil, da diese Ionenpumpe auch als Na⁺,K⁺-ATPase arbeiten kann, aber erst durch höhere Ouabainkonzentrationen inhibiert wird. So können diese Zellen länger ihre Elektrolythomöostase aufrechterhalten.

Selektion mit Antibiotika

Abhängig von den Plasmid-vermittelten Resistenzgenen wurden G 418 in einer Konzentration von 1 µg/ml und, oder Hygromycin B in einer Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Nach erfolgreicher Selektion wurde die Antibiotikakonzentration auf 2 µg/ml Hygromycin B u.o. 0,5 µg Geneticin 418 reduziert.

2.8.10.3 Einzelzellklonierung

Um eine stark exprimierende Zelllinie zu erhalten, wurde eine Einzelzellklonierung durchgeführt. Hatten sich die Zellen nach erfolgreicher Transfektion und Selektion ausreichend vermehrt, wurden sie gesplittet. Nach der Zellzahlbestimmung wurden ca. 40 Zellen in 25 ml Medium aufgenommen und auf eine 96-well Platte verteilt. Ziel war es, möglichst nur eine Zelle pro Kavität auszusäen. Der Rest wurde teils eingefroren und teils weiter in Kultur gehalten. Nach ca. 2 Wochen waren aus den Einzelzellen in den 96-well Kavitäten ausreichend große Kolonien entstanden. Diese nun klonalen Zellen wurden wieder gesplittet, auf 24-well Platten weitergeführt und zum Screenen auf Labtek (oder nur einem beschichteten Objektträger) ausgesät. Mit stark exprimierenden Klonen konnte weitergearbeitet werden, die anderen Klone wurden verworfen.

3. Ergebnisse

3.1 Eingrenzung des apikalen Sortierungssignals von ATP1AL1

ATP1AL1, die humane nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase, ist mit der Na^+,K^+ -ATPase, wie auch mit der gastrischen H^+,K^+ -ATPase, eng verwandt (~ 63 % Aminosäureidentität). Während die Na^+,K^+ -ATPase in den meisten Epithelzelllinien basolateral lokalisiert ist, werden die gastrische und die nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase jedoch apikal verteilt. Diese charakteristische, unterschiedliche Aufteilung von ATP1AL1 und der Na^+,K^+ -ATPase in der Plasmamembran wird in Abb. 3.1 an MDCK-Wildtyp-Zellen gezeigt. Sie verdeutlicht die intakte Polarisierungsfähigkeit dieser Zellen, die auch zur Expression der ATP1AL1- Na^+,K^+ -ATPase- α_1 -Chimären verwendet wurden.

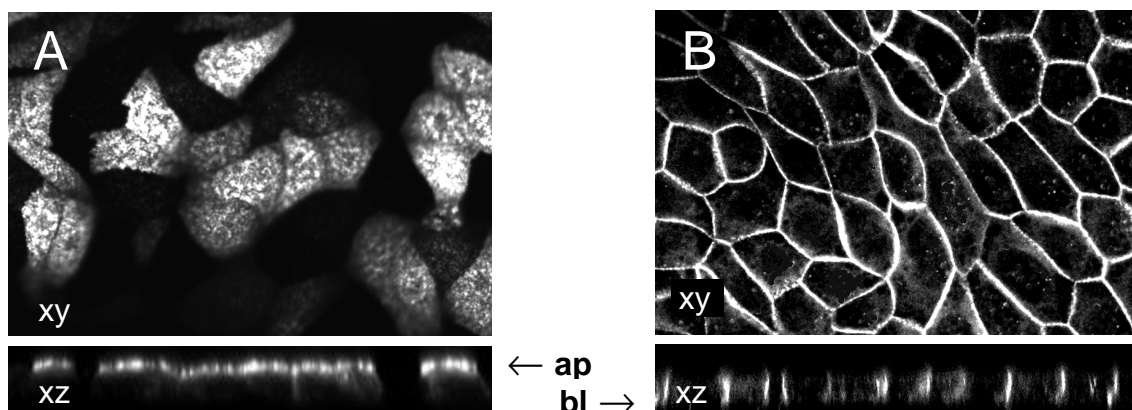


Abb. 3.1:

Die Konfokalbilder zeigen die Verteilung von ATP1AL1 (A), und der Na^+,K^+ -ATPase (B) in der Plasmamembran polarisierter MDCK-Zellen, die auf Filter (Costar) gewachsen sind. Die xz-Schnitte verdeutlichen die apikale (ap) Lokalisation von ATP1AL1 und die basolaterale (bl) der Na^+,K^+ -ATPase. Für die Immunfluoreszenz wurden spezifische Antikörper gegen ATP1AL1 und die endogene Na^+,K^+ -ATPase- β verwendet.

Chimäre I: Es wurde bereits gezeigt, dass die gastrische H^+,K^+ -ATPase in ihrer 4. TMD (29 AS) ein entscheidendes apikales Sortierungssignal besitzt. Daher wurde zuerst analog zu diesem Ergebnis auch die 4. TMD der verwandten nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPase, ATP1AL1, auf ein apikales Signal hin untersucht. Dazu entstand Chimäre I, bei der dieser Proteinbereich und 3 weitere AS der 2. Ektodomäne aus der Na^+,K^+ -ATPase- α_1 (AS 317-346^{*}) entfernt und durch den entsprechenden Teil aus ATP1AL1 (AS 332-361) ersetzt wurden. Diese 30 AS beider Proteine sind ~83% zueinander identisch (Gesamtübereinstimmung: ~ 63 %). Transfizierte MDCK-Zellen exprimieren die Chimäre I ausschließlich in der basolateralen Plasmamembran, wie Abb. 3.2, A) zeigt. Zur Sortierung der Na^+,K^+ -ATPase- α_1 besteht kein Unterschied. Das apikale Sortierungssignal von ATP1AL1 muß daher im Unterschied zur gastrischen H^+,K^+ -ATPase in einer anderen Region als der 4. TMD integriert sein.

Chimäre II: Der Proteinbereich, der n-terminal von der 4. TMD liegt, ist zwischen ATP1AL1 (1-329) und Na^+,K^+ -ATPase- α_1 (AS 1-314^{*}) nur zu ~ 58 % homolog. Er wurde in der Sequenz der Na^+,K^+ -ATPase- α_1 durch die entsprechenden 329 AS von ATP1AL1 ersetzt. Abbildung 3.3 (A) demonstriert, dass die resultierende Chimäre II in der apikalen und auch in der basolateralen Membran lokalisiert ist. Die Sortierungsinformation ist durch den einklonierten Anteil von ATP1AL1 im Vergleich zur rein basolateralen Na^+,K^+ -ATPase- α_1 verändert.

Punktmutationen der Chimären: Bei den Chimären I und II liegt die Schnittstelle zwischen den ausgetauschten Sequenzen in der 2. Ektodomäne, die aus insgesamt 6 AS besteht. Chimäre I hat hier die Sequenz „**E**, Y, T, V, L, D^{*}“ und Chimäre II „**K**, Y, T, W, L, E^{*}“. Im weiteren Vergleich zu ATP1AL1 und zur Na^+,K^+ -ATPase- α_1 fällt die erste AS in dieser Domäne auf (siehe auch Tab. 4.1). Die basolaterale Na^+,K^+ -ATPase- α_1 hat hier, wie die ebenfalls basolateral lokalisierte Chimäre I, die AS *Glutamat* (**E**). ATP1AL1 besitzt in dieser Position aber, wie die Chimäre II, die AS „Lysin“ (**K**). Diese beiden Proteine sind apikal, bzw. apikal und basolateral verteilt. Um die Relevanz dieser auch unterschiedlich elektrisch geladenen Aminosäuren für die Sortierung zu prüfen, wurden Chimären I und II punktmuiert. Bei Chimäre I-P (Punktmutation) wurde *Glutamat* (**E**) durch Lysin (**K**) ersetzt. Umgekehrt wurde Lysin (**K**) bei Chimäre II-P durch *Glutamat* (**E**) ausgetauscht. Die erste Punktmutante, Chimäre I-P, wird in der gesamten Plasmamembran lokalisiert (Abb. 3.2, B). Bei Chimäre II-P führte die Mutation in umgekehrter Weise zu einer Veränderung der Sortierung. Sie ist nur noch auf die basolaterale Membran begrenzt. (Abb. 3.3, B).

^{*} zur besseren Übersicht sind die Aminosäuren der Na^+,K^+ -ATPase- α_1 kursiv hervorgehoben

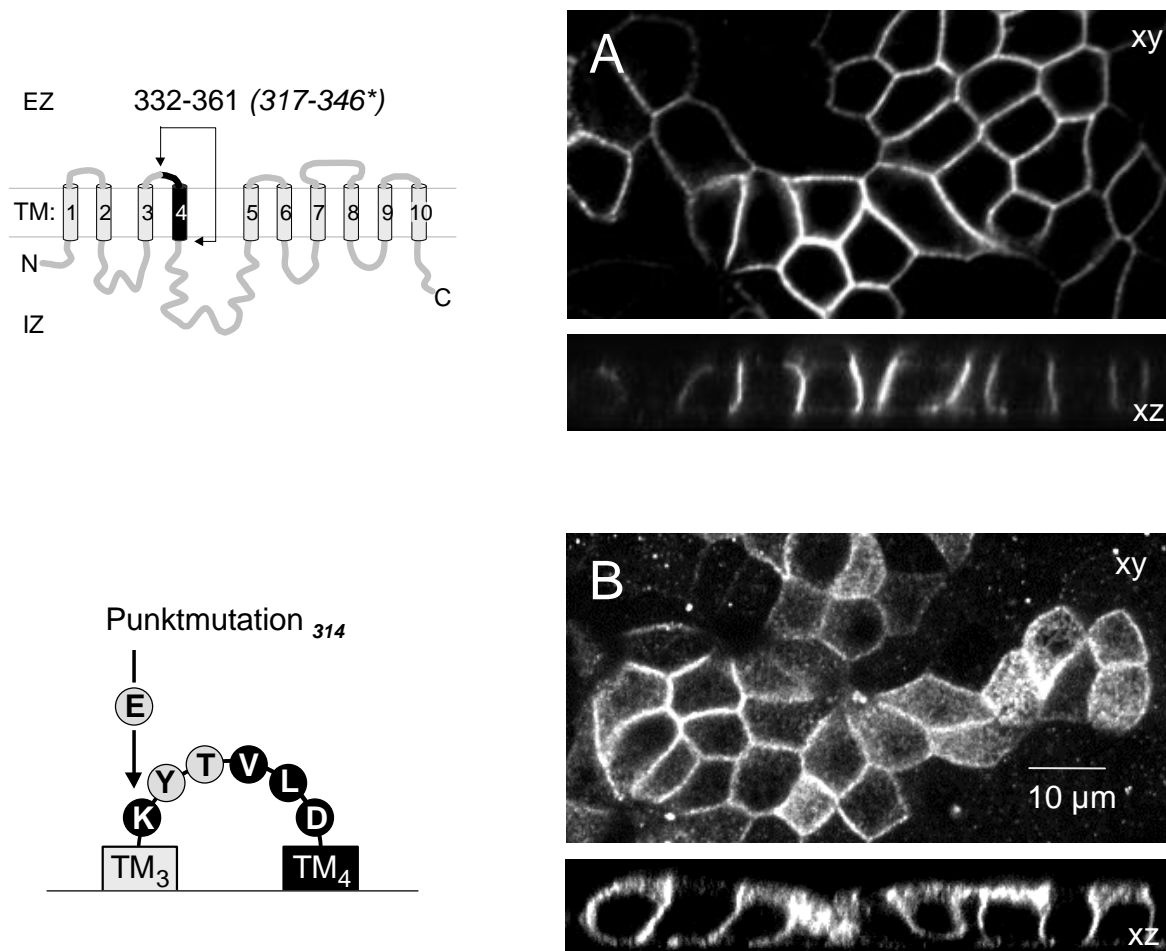


Abb. 3.2:

Immunfluoreszenzbilder von transfizierten MDCK-Zellen zeigen Chimäre I (A) und ihre Punktmutante, Chimäre I-P (B), in konfokalen xy- und xz- Schnitten. Schemata demonstrieren die Struktur der Chimären, die sich aus ATP1AL1 (schwarz) und Na^+, K^+ -ATPase- α_1 (grau) zusammensetzen. Die Aminosäuren 332-361 von ATP1AL1 ersetzen die strukturell korrespondierenden AS 317-346* der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 , wodurch 3 AS der 2. Ektodomäne sowie fast die ganze 4. TMD ausgetauscht werden.

AS 314* der Chimäre I ist *Glutamat* (E), das durch Lysin (K) ersetzt wurde. So entstand Chimäre I-P. Während Chimäre I eindeutig auf die basolaterale Membran begrenzt ist (A), findet sich Chimäre I-P in der apikalen und basolateralen Plasmamembran (B).

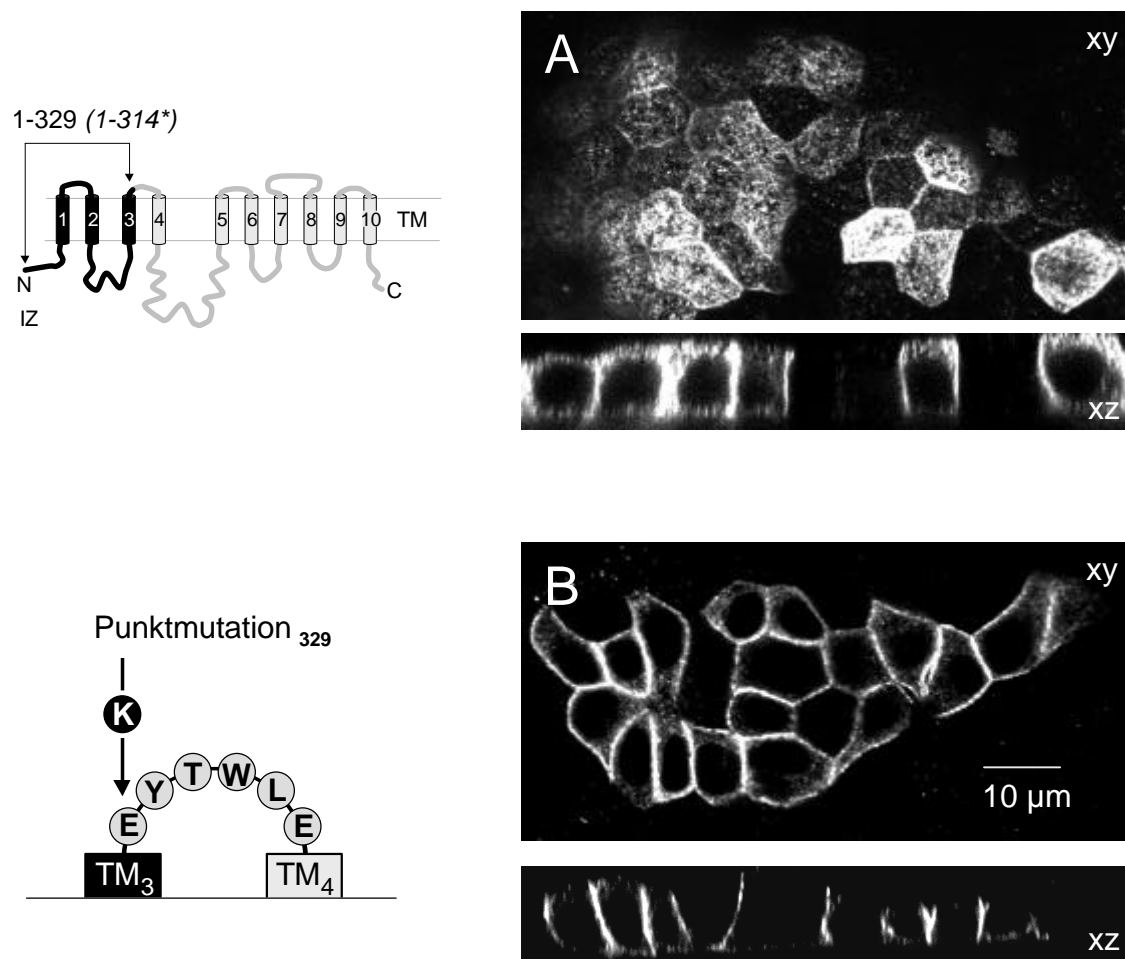


Abb. 3.3:

Konfokalbilder von transfizierten MDCK-Zellen stellen Chimäre II (A) und ihre Punktmutante, Chimäre II-P (B), in xy- und xz- Schnitten dar. Die Modelle zeigen die Struktur der Chimären, die sich aus ATP1AL1 (schwarz) und Na⁺,K⁺-ATPase-α₁ (grau) zusammensetzen. Der N-Terminus (AS 1-329) von ATP1AL1 ersetzt den N-Terminus (AS 1-314*) der Na⁺,K⁺-ATPase-α₁.

AS 329, Lysin (K), ist die erste AS in der 2. Ektodomäne von Chimäre II. Sie wurde in Chimäre II-P durch *Glutamat* (E)* ersetzt. Chimäre II wird in beiden Membrandomänen, apikal und basolateral, lokalisiert (A). Ihre Punktmutante ist auf die basolaterale Membran begrenzt (B).

3.2 Vergleich des Fusionsproteins GFP-ATP1AL1 mit ATP1AL1

Um die Sortierung von ATP1AL1 in lebenden Zellen zu demonstrieren, wurde das Autofluoreszenzprotein GFP an die Ionenpumpe gekoppelt. Das GFP-Molekül hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Es wurde, wie unter 1.1.5 beschrieben, dem intrazellulär liegenden N-Terminus von ATP1AL1 angefügt. Das so entstandene Fusionsprotein wurde analog zu ATP1AL1 mit der β -Untereinheit der gastrischen H^+,K^+ -ATPase in MDCK-Zellen stabil kotransfiziert.

Zuerst wurde getestet, ob GFP die Membranintegration der Ionenpumpe beeinflusst. Erste Bilder von auf beschichtetem Glas gezüchteten Zellen zeigten das Protein eindeutig in der Plasmamembran. Allerdings war das Expressionsniveau niedrig. Eine Hilfe für die Selektion der exprimierenden Zellen war die funktionelle Klonierung mit der Na^+,K^+ -ATPase-blockierenden Substanz Ouabain (Strophantin G). Nach Inkubation mit Ouabain ($0,5 \mu M$, 3d) war der Anteil der Zellen mit GFP-ATP1AL1 deutlich gestiegen ($\sim 50 \%$). In dieser Konzentration ($0,5 \mu M$) wird ATP1AL1 im Gegensatz zur Na^+,K^+ -ATPase nicht blockiert. So konnte indirekt geprüft werden, ob GFP die Transportfunktion von ATP1AL1 beeinträchtigt, da nur eine funktionierende nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase die blockierte Na^+,K^+ -ATPase kompensieren und so den Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen kann. Aus der Steigerung des Expressionsniveaus kann geschlossen werden, dass auch die katalytische Funktion von GFP-ATP1AL1 intakt ist. Abb. 3.4 zeigt die Membranlokalisierung von GFP-ATP1AL1 in lebenden MDCK-Zellen, die auf beschichtetem Glas gezüchtet wurden. Das Protein ist eindeutig in der gesamten Plasmamembran dieser nicht vollständig auspolarisierten Glas-Zellen zu finden.

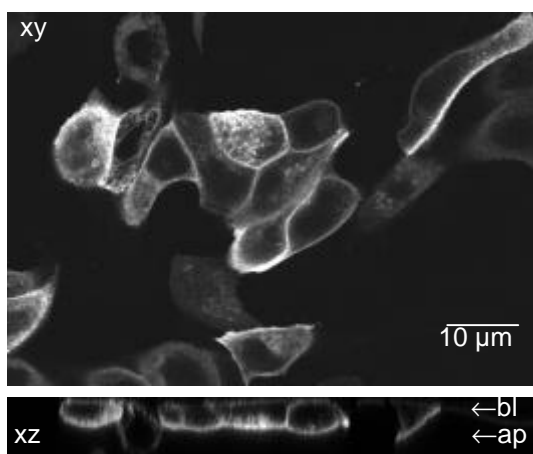


Abb. 3.4:

Autofluoreszenz-Aufnahmen (xy, xz) von GFP-ATP1AL1 in MDCK-Zellen, die auf beschichtetem Glas kultiviert und mit Natriumbutyrat (10 mM , 12 h) stimuliert wurden. Die lebenden Zellen wurden während der Aufnahme in Hepespuffer ($37^\circ C$) inkubiert. Das Protein ist in der gesamten, noch unvollständig polarisierten Plasmamembran lokalisiert.

Als nächstes wurden die transfizierten Zellen auf Filtern angezüchtet, um die Verteilung in der differenzierten Plasmamembran und die Assoziation mit der kotransfizierten β -Untereinheit der gastrischen H^+,K^+ -ATPase (gHK- β) zu testen. Spezifische Immunfluoreszenzen beider Untereinheiten (A = alpha, B = beta) werden in Abb. 3.5 gezeigt. GFP-ATP1AL1 hat die charakteristische apikale Verteilung (A) wie sie auch bei ATP1AL1 ohne GFP bekannt ist und ist mit der gHK- β kolokalisiert (A+B).

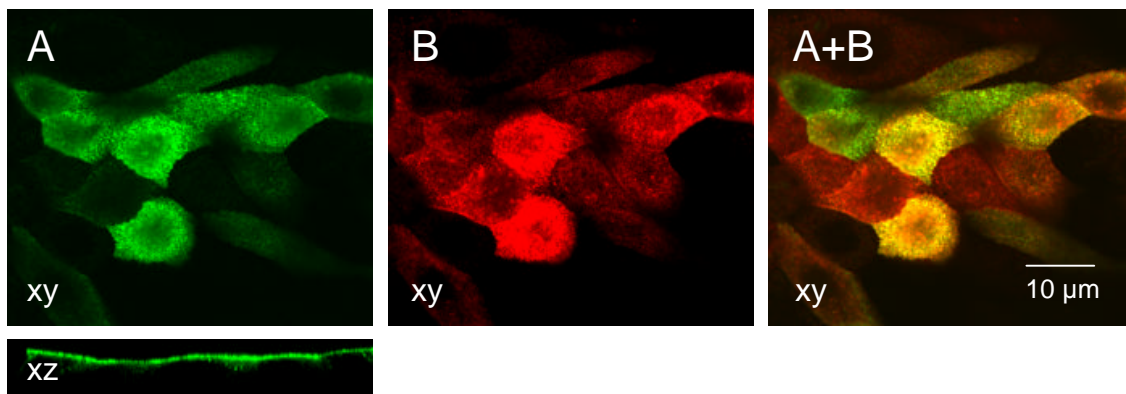


Abb. 3.5:

Kolokalisation (A+B) von GFP-ATP1AL1 (A) und der gastrischen H^+,K^+ -ATPase- β (B) in stabil transfizierten MDCK-Zellen, die auf Filter (Costar, 0,4 μm Porengröße) gewachsen sind. Es sind konfokale xy- und xz-Schnitte der zuvor fixierten Zellen dargestellt. Das Heterodimer wird in der apikalen Plasmamembran lokalisiert. Die Zellen wurden zuvor 12 h mit 10 mM Natriumbutyrat inkubiert. Kolokalisiertes Protein ist gelb dargestellt (A+B).

Eine Assoziation von GFP-ATP1AL1 mit der endogen vorkommenden Na^+, K^+ -ATPase- β kann dagegen nicht beobachtet werden (Abb. 3.6).

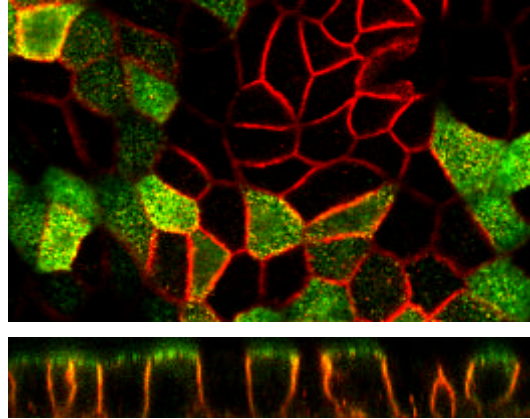


Abb. 3.6:

Immunfluoreszenz von transfizierten MDCK-Zellen. GFP-ATP1AL1 (grün) ist in transfizierten MDCK-WT-Zellen nicht mit der β -Untereinheit der endogen vorkommenden Na^+, K^+ -ATPase (rot) assoziiert.

Die apikale Polarisierung von GFP-ATP1AL1 wurde durch Western Blotting bestätigt. Abb. 3.7 zeigt die entsprechende Bande von 135 kDa nur in der apikalen Proteinfraction.

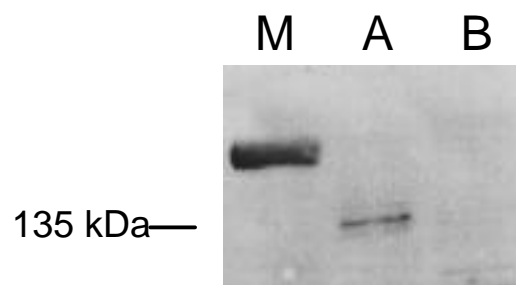


Abb. 3.7:

Western Blot nach selektiver Oberflächenbiotinylierung der apikalen (A) und basolateralen (B) Membran von auf Filtern kultivierten MDCK-Zellen. Der Marker (M) zeigt eine Bande bei 122 kDa. GFP hat eine Größe von 25 kDa, ATP1AL1 ist ca. 110 kDa groß. Das Fusionsprotein, 135 kDa, findet sich nur in der apikalen Proteinfraction.

3.3 In vivo Transport von ATP1AL1

Mit GFP-ATP1AL1 und gHK- β kotransfizierte MDCK-Zellen exprimieren nach einem Stimulus (Natriumbutyrat, 10 mM) die Proteine in ihrer Plasmamembran. Erste durch GFP sichtbare Proteinmengen können nach ~6 h nachgewiesen werden. Nach weiteren 2 h lässt sich Membranintegration beobachten. Nach insgesamt 12 h Stimulation ist die Plasmamembran stark durch die integrierten GFP-ATP1AL1-Moleküle angefärbt. Abb. 3.8 zeigt Zellen, die 8 h mit Natriumbutyrat stimuliert wurden. GFP-ATP1AL1 scheint während des Transports zur Plasmamembran an zytoskelettalen Strukturen gebunden sein.

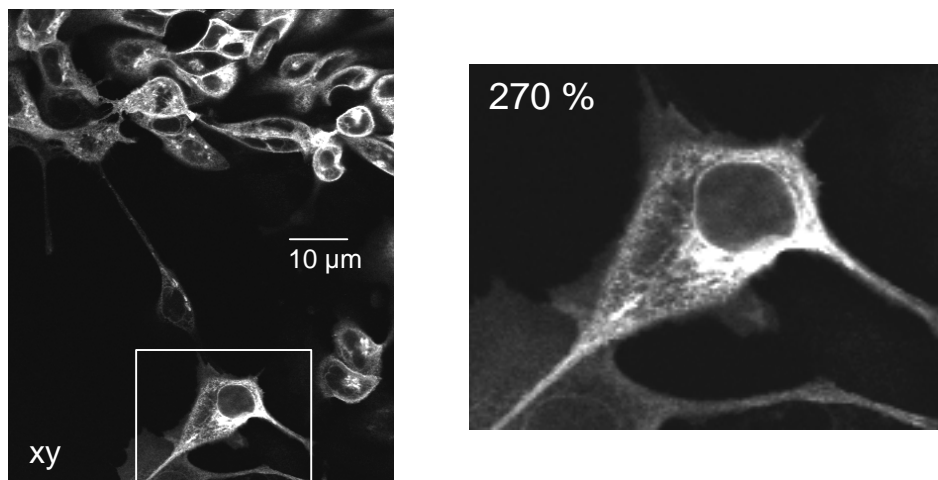


Abb. 3.8:

Mit GFP-ATP1AL1 transfizierte MDCK-WT-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtetem Glas gezüchtet und für 8 h in MEM + 10 mM Natriumbutyrat inkubiert. Für die in-vivo-Aufnahme mit dem Konfokallasermikroskop wurden die Zellen in Hepes (37°C) inkubiert.

Ein essentieller Bestandteil des Zytoskeletts ist das Mikrotubulisystem (MT-System). Es wurde durch Inkubation mit Nokodazol (33 µM in DMSO) irreversibel zerstört, um seinen Einfluß auf die Sortierung von ATP1AL1 zu testen. So behandelte auf Glas gezüchtete MDCK-Zellen exprimieren GFP-ATP1AL1 nur noch schwach in der Plasmamembran, während ein Teil des Proteins intrazellulär akkumuliert (Abb. 3.9). Filterzellen zeigen nach Inkubation mit Nokodazol GFP-ATP1AL1 ebenfalls teilweise

intrazellulär. Das übrige GFP-ATP1AL1 verteilt sich unpolarisiert in der apikalen und basolateralen Plasmamembran (Abb. 3.10). Durch Inkubation mit der Mikrotubulizerstörenden Substanz Nokodazol wird der Transport von GFP-ATP1AL1 zur Plasmamembran in Glas- und Filterzellen stark beeinflusst.

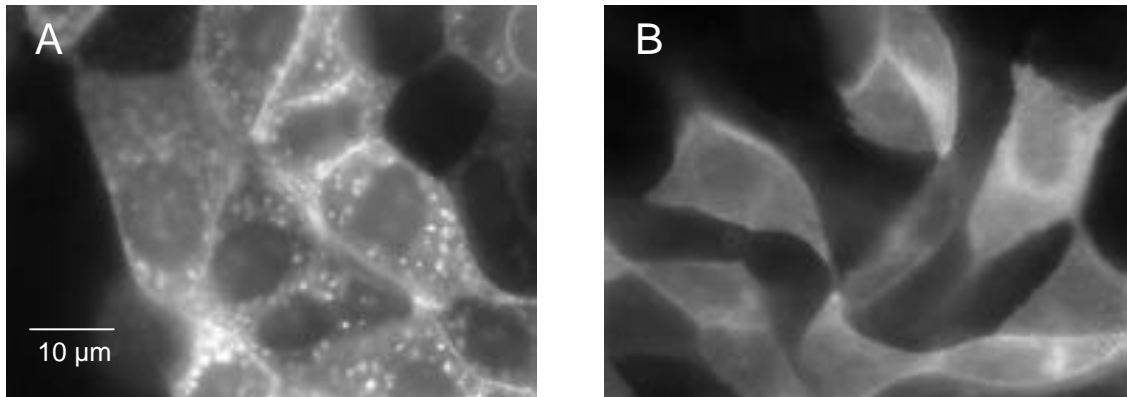


Abb. 3.9:

Nach Vorinkubation mit 33 µM Nokodazol (in DMSO) wird GFP-ATP1AL1 in MDCK-Zellen, gewachsen auf beschichtetem Glas, sowohl intrazellulär als auch schwach in der Membran lokalisiert (A). Die DMSO-Kontrolle (B) zeigt eine normale Proteinverteilung.

Auf Filter gezüchtete Zellen zeigen ein ähnliches Bild nach Nokodazolbehandlung. Hier wird GFP-ATP1AL1 in der basolateralen und apikalen Membran gefunden. GFP-ATP1AL1 akkumuliert auch intrazellulär (Abb. 3.10).

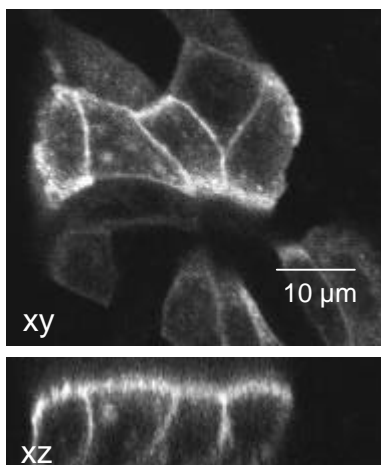


Abb. 3.10:

Auf Filter gewachsene MDCK-Zellen zeigen GFP-ATP1AL1 in vivo nach Vorinkubation mit 33 µM Nokodazol in beiden Membrandomänen sowie intrazellulär. Für die konfokale Aufnahme wurden die Zellen auf der Filterunterseite angezüchtet und in einer Wärmekammer mit 37°C HEPES-Puffer inkubiert. Es ist ein xy-Schnitt mit entsprechendem xz-Schnitt dargestellt.

In der Plasmamembran wird die Aktivität der nicht gastrischen H^+,K^+ -ATPase durch Endozytose nach Aktivierung des Proteinkinase C (PKC) -Pfades reguliert, wie kürzlich gezeigt werden konnte (62). PKC kann durch den Phorbolster PMA angeregt werden. Im Western Blot konnten entsprechende Ergebnisse auch für GFP-ATP1A1 bestätigt werden (Abb. 3.11). Nach PKC-Stimulation durch PMA [100 nM] kommt es zur schnellen Endozytose von ATP1A1, so dass nach 30 min ATP1A1 nicht mehr in der Plasmamembran lokalisiert werden kann.

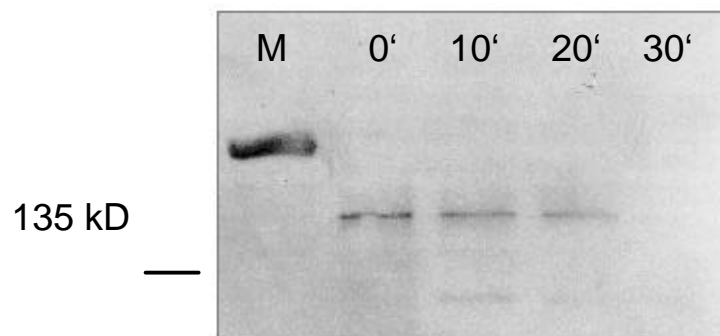


Abb. 3.11:

Western Blot von selektiv apikal biotinylierten, auf Filtern gewachsenen, MDCK-Zellen, die GFP-ATP1A1 stabil exprimieren. Nach 12 h Inkubation mit 10 mM Natriumbutyrat wurden die Zellen jeweils 0, 10, 20 und 30 min mit 100 nM PMA inkubiert. Es zeigt sich eine deutliche Proteinabnahme, nach 30 min ist kein Protein mehr in der Plasmamembran nachweisbar.

4. Diskussion

4.1 Die Chimärenstrategie

Durch eine Reihe von Studien konnte bisher die Lokalisation von ATP1AL1 in der apikalen Membran von Epithelzellen belegt werden (36;44;58). Es ist aber anzumerken, dass z.B. LLC-PK1-Epithelzellen ATP1AL1 in die basolaterale Membran sortieren (61). Zellspezifische Unterschiede in der Sortierung zeigen sich auch bei anderen Transmembranproteinen wie der gastrischen H^+,K^+ -ATPase (7) oder der Na^+,K^+ -ATPase (39) und sind durchaus physiologisch: Verschiedene Epithelzelltypen benutzen auch verschiedene Sortierungsmechanismen. Das versetzt sie in die Lage, die Membranlokalisation selbst von ubiquitär im Organismus gleich kodierter Proteine zellspezifisch zu verändern und sie auf diese Weise anders einzusetzen. Der Sortierungsapparat übernimmt somit eine entscheidende Funktion. Er ist von Signalen abhängig, die in der Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins integriert sind und so erst die Membranzuordnung ermöglichen. In der Einleitung wurde schon ausführlich auf unterschiedliche Sortierungssignale und -mechanismen eingegangen, die bislang für ATP1AL1 aber nicht bewiesen werden konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Eingrenzung des apikalen Sortierungssignals von ATP1AL1 diskutiert und seine mögliche Funktionsweise dargestellt. Auch Ergebnisse zur Sortierung der Na^+,K^+ -ATPase, die als Chimärenpartner zur nicht gastrischen (ng) H^+,K^+ -ATPase eingesetzt wurde, werden erörtert.

Die Sortierung der Na^+,K^+ -ATPase und dafür relevante Signale sind bisher nicht genau definiert. Bekannt ist, dass der N-Terminus (AS 1-500) eine wichtige Region für ein basolaterales Signal ist (54) und der Verankerung in der Plasmamembran über Ankyrine eine bedeutende Rolle bei der Polarisierung der ATPase zukommt (55). Daher musste bei dieser Chimärenstrategie davon ausgegangen werden, dass sich unbekannte Sortierungssignale sowohl in der Na^+,K^+ -ATPase- α_1 wie auch in der ng H^+,K^+ -ATPase- α befinden.

So ergaben sich für die Chimären aus diesen beiden Proteinen drei Möglichkeiten: Sie konnten erstens nur apikale, zweitens nur basolaterale oder drittens apikale und basolaterale Sortierungsinformationen besitzen. Letztendlich kann ein Chimärenprotein aber nur auf eine Membrandomäne begrenzt sein, wenn dieses ein einziges oder ein dominantes Sortierungssignal besitzt. Daher gibt auch schon eine Veränderung im

Sortierungsverhalten, wie z.B. die Proteinlokalisierung in beiden Membrandomänen, wichtige Hinweise auf das Sortierungssignal.

4.2 Die Sortierung der Chimären

Die Na^+, K^+ -ATPase- α_1 wurde als Gerüst für die Chimären verwendet, in dem zu ATP1AL1 korrespondierende Bereiche ersetzt wurden (Gesamtübereinstimmung beider Proteine: ~ 63 %). Das Ziel war, eine apikale Sortierungsinformation in die Na^+, K^+ -ATPase- α_1 zu integrieren. Das resultierende Chimärenprotein müsste dann, mit diesem Signal ausgestattet, auch in der apikalen Membran zu finden sein. Die Chimärenstrategie ist eine bewährte Methode und wurde auch bei der Identifizierung des apikalen Signals der gastrischen H^+, K^+ -ATPase angewandt. Hier wurden 8 AS in der 4. Transmembrandomäne (4. TMD) als ausreichendes aber nicht vollständiges Signal bestimmt (26).

	2. ED										4. TMD																								
ATP1AL1	K	Y	Q	V	L	D	S	I	I	F	L	I	G	I	I	V	A	N	V	P	E	G	L	L	A	T	V	T	V	T	L	S	L	T	A
Na^+, K^+ -ATPase- α_1	E	Y	T	W	L	E	A	V	I	F	L	I	G	I	I	V	A	N	V	P	E	G	L	L	A	T	V	T	V	C	L	T	L	T	A
g H^+, K^+ -ATPase- α	G	Y	T	F	L	R	A	M	V	F	F	M	A	I	V	V	A	Y	V	P	E	G	L	L	A	T	V	T	V	C	L	S	L	T	A
Konsensus	Y				L					F				I		V	A		V	P	E	G	L	L	A	T	V	T	V	L		L	T	A	

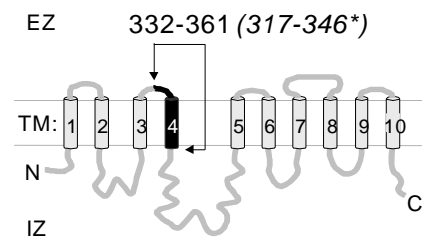
Abb. 4.1:

Sequenzvergleich zwischen den der nicht gastrischen H^+, K^+ -ATPase- α „ATP1AL1“, der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 und der gastrischen (g) H^+, K^+ -ATPase- α im Bereich der 2. Ekto-domäne (2. ED) und der 4. Transmembrandomäne (4. TMD). Die Nummerierung ist in dem Alignment an ATP1AL1 ausgerichtet. Der N-Terminus der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 ist um 15 AS kürzer als der von ATP1AL1, der von der gastrischen H^+, K^+ -ATPase- α ist nur um 4 AS kürzer. Daher entspricht AS 329 von ATP1AL1 den Positionen 314 bei Na^+, K^+ -ATPase- α_1 und 325 bei der gastrischen H^+, K^+ -ATPase- α . Zueinander gleiche Aminosäuren aus den verschiedenen Sequenzen sind weiß hinterlegt.

Wie eine Sequenzanalyse (Abb. 4.1) vermuten ließ, ist die Sortierung der ng H^+, K^+ -ATPase anders als bei der gastrischen H^+, K^+ -ATPase vermutlich nicht von der 4. TMD abhängig. ATP1AL1 zeigt eine größere Homologie in den 29 AS (AS 335-363), welche

die 4. TMD bilden, zur Na^+, K^+ -ATPase- α_1 als die gastrische H^+, K^+ -ATPase- α zur Na^+, K^+ -ATPase- α_1 aufweist. Der Unterschied besteht in nur 4 AS (AS 335, 336, 358, 360), während die gastrische Verwandte 8 andere AS (AS 336, 337, 339, 340, 341, 344, 347, 360) in diesem Proteinabschnitt besitzt. Nur AS 360 ist dabei sowohl unter den beiden H^+, K^+ -ATPasen gleich als auch zur Na^+, K^+ -ATPase- α_1 unterschiedlich. Insgesamt weicht die 4. TMD von ATP1AL1 in 9 AS von der 4. TMD der gastrischen H^+, K^+ -ATPase- α ab. Der Unterschied ist damit sogar größer als zwischen den 4. TMDs der gastrischen H^+, K^+ -ATPase- α und der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 . Ein anderer Hinweis ist die unterschiedliche Sortierung der nicht gastrischen und der gastrischen H^+, K^+ -ATPase- α in LLC-PK1-Zellen, was das Vorhandensein anderer Sortierungssignale weiter wahrscheinlicher macht (61).

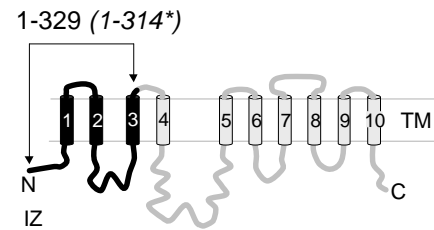
Überprüft werden konnte die Hypothese unterschiedlicher apikaler Sortierungssignale letztendlich durch Chimäre I. Sie wurde analog zur Chimärenstrategie konzipiert, die bei der gastrischen H^+, K^+ -ATPase angewandt wurde. Die 4. TMD umfaßt 29 AS (ATP1AL1: AS 335-



363 bzw. Na^+, K^+ -ATPase- α_1 : AS 320-348^{*}). Durch die Hpa I-Schnittstelle kommt es zwar schon nach AS 361 (bzw. 346^{*}) zu einer Trennung, AS 362 und 363 (bzw. AS 347 und AS 348^{*}) sind aber bei allen DNAs gleich und somit nicht relevant. Der Austausch der fast ganzen 4. TMD (27 AS) und Teile der 2. Ektodomäne (3 AS) von der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 durch die korrespondierenden 30 AS von ATP1AL1 führte bei Chimäre I zu keiner Veränderung der Sortierung. Das strikte basolaterale Verteilungsmuster der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 wurde beibehalten. Dies war der Beweis für eine anders als bei der gastrischen H^+, K^+ -ATPase geartete Sortierungsinformation, welche die vorherrschende apikale Proteinlokalisierung von ATP1AL1 in transfizierten MDCK-Zellen bestimmt. Für die Sortierung der Na^+, K^+ -ATPase bedeutet dies, dass in diesem Bereich kein dominantes basolaterales Signal sein kann, was aufgrund der hohen Übereinstimmung in diesem Abschnitt (~ 83 %) auch zu erwarten war.

^{*} zu ATP1AL1 korrespondierende Aminosäuren der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 sind kursiv hervorgehoben

Die N-Termini (AS 1-329, bzw. AS 1-314*) beider Proteine sind dagegen nur zu ~58% identisch. Um ATP1AL1 in diesem Bereich auf ein apikales Signal hin zu untersuchen, wurde der N-Terminus der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 durch den von ATP1AL1 ersetzt. Dadurch entstand Chimäre II. Dieses Protein wurde



nun zu gleichen Teilen sowohl in der apikalen wie auch der basolateralen Membran lokalisiert. Nun musste geklärt werden, ob im N-Terminus von ATP1AL1 tatsächlich ein apikales Signal vorliegt. In diesem Fall müsste ja auch ein ebenso starkes basolaterales im C-Terminus der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 sein (AS 315-1023*). Eine andere Möglichkeit für die Verteilung der Chimäre II in beiden Membrandomänen wäre nämlich die Entfernung des basolateralen Signals der Na^+, K^+ -ATPase- α_1 im N-Terminus (AS 1-314*) durch den ATP1AL1-Anteil (AS 1-329). Dann wäre die Lokalisierung in beiden Membrandomänen nur das Resultat einer zufälligen Verteilung, da kein spezifisches Sortierungssignal, auch kein apikales, mehr existieren würde. Wäre letzteres der Fall, würde die Chimäre II ja ausschließlich apikal lokalisiert sein.

4.3 Die Sortierung der Punktmutanten

Bei erneuter Sequenzanalyse fiel im Vergleich zwischen Na^+, K^+ -ATPase- α_1 , ATP1AL1, Chimäre I und Chimäre II jedoch eine Aminosäure auf. Es handelt sich um die erste Aminosäure der zweiten Ektodomäne. Diese entspricht strukturell der Position 329 in ATP1AL1 und der Position 314 in Na^+, K^+ -ATPase- α_1 . Die streng basolateralen Na^+, K^+ -ATPase- α_1 und Chimäre I haben hier die AS Glutamat (E). ATP1AL1 und die ebenfalls auch in der apikalen Membran lokalisierte Chimäre II haben aber an gleicher Stelle ein Lysin (K), (Abb. 4.1, Seite 63).

Dieses Lysin ist bis auf die amphibische (*Bufo marinus*) bei allen bisher bekannten nicht gastrischen H^+, K^+ -ATPasen konserviert. Glutamat ist ebenfalls bei der amphibischen Na^+, K^+ -ATPase nicht konserviert, aber auch die anderen zwei menschlichen Isoformen der Na^+, K^+ -ATPase zeigen eine andere Aminosäure (G=Glycin) in dieser Position (Abb. 4.2, Seite 63).

Protein	3. TMD	← 2. ED →	4. TMD	Sortierung
		1 2 3 4 5 6		
ATP1AL1		K Y Q V L D		apikal
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₁		E Y T W L E		basolateral
Chimäre I		E Y T V L D		basolateral
Chimäre I-P		K Y T V L D		apikal + basolateral
Chimäre II		K Y T W L E		apikal + basolateral
Chimäre II-P		E Y T W L E		basolateral

Abb. 4.1:

Die 6 Aminosäuren (AS) der 2. Ektodomäne (ED) sind in Zusammenhang zur Sortierung ihrer Proteine dargestellt. Von ATP1AL1 stammende AS sind schwarz, die von Na⁺,K⁺-ATPase-α₁ grau hinterlegt.

Mensch, Na⁺,K⁺-ATPase-α₁	309	S L I L	E Y T W L E	A V I F
Mensch, Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₂	307	S L I L	G Y S W L E	A V I F
Mensch, Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₃	299	S L I L	G Y T W L E	A V I F
<i>Oryctolagus cuniculus</i> , Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₁				
	309	S L I L	E Y T W L E	A V I F
<i>Rattus norvegicus</i> , Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₁				
	309	S L I L	E Y T W L E	A V I F
<i>Bufo marinus</i> , Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₁				
	309	S L I L	H Y T W L E	A V I F
<i>Xenopus laevis</i> , Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α ₁				
	311	S L I L	Q Y T W L E	A V I F
Konsensus		S L I L	Y W L E	A V I F
<hr/>				
Mensch, ATP1AL1	325	A V S L	K Y Q V L D	S I I F
<i>Cavia porcellus</i> , ng H ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α	319	A V S L	K Y R V L D	S I I F
<i>Oryctolagus cuniculus</i> , ng H ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α	319	A V C M	K Y H V L D	A I I F
<i>Rattus norvegicus</i> , ng H ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α	322	A V C M	K Y Y V L D	A I I F
<i>Mus musculus</i> , ng H ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α	321	A V C M	K Y Y V L D	A I I F
<i>Bufo marinus</i> , ng H ⁺ ,K ⁺ -ATPase-α	328	A I C M	G Y S A L N	S I I F
Konsensus		A	Y L	I I F

Abb. 4.2:

Sequenzvergleich im Bereich der 2. extrazellulären Domäne (2. ED) zwischen den Isoformen der menschlichen Na⁺,K⁺-ATPase-α₁₋₃, tierischer Na⁺,K⁺-ATPasen-α₁ und den nicht gastrischen H⁺,K⁺-ATPasen-α des Menschen und anderer Spezies. Zur menschlichen Na⁺,K⁺-ATPasen-α₁ und zu ATP1AL1 unterschiedliche Aminosäuren sind jeweils grau hinterlegt.

Um die Rolle dieser einen Aminosäure für die Sortierung des gesamten Proteins zu klären, wurden sowohl Chimäre I als auch Chimäre II an dieser Stelle (AS 329, bzw. AS 314*) mutiert. Chimäre I erhielt statt *Glutamat* ein Lysin, umgekehrt wurde bei Chimäre II Lysin zu *Glutamat* verändert. Das Ergebnis war in beiden Fällen überraschend. Chimäre I war zuvor eindeutig auf die basolaterale Membran begrenzt. Ihre Punktmutante, Chimäre I-P, wurde nun jedoch basolateral und apikal lokalisiert. Dabei unterscheidet sich Chimäre I-P nur in 7 Aminosäuren von der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 , von denen 6 AS keinen Effekt auf die Sortierung hatten, wie Chimäre I belegt. Chimäre II-P zeigt die exakte Umkehrung im Sortierungsverhalten. Die Mutation führte zu einer eindeutigen Begrenzung auf die basolaterale Membran, während Chimäre II zusätzlich in der apikalen Membrandomäne exprimiert wird. So scheint der restliche N-Terminus (AS 1-328) doch keine Sortierungsinformation zu besitzen. Er ist nur zusammen mit Lysin in Position 329 in der Lage, das Chimärenprotein auch apikal zu platzieren. Ebenso kann Chimäre I-P auch ohne den N-Terminus von ATP1A1 in der apikalen Membran gefunden werden. Das Lysin in Position 329 scheint also eine entscheidende Rolle für die apikale Sortierung von ATP1A1 zu spielen.

4.4 Das basolaterale Sortierungssignal der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1

Die Chimären I-P und II, ausgestattet mit dem positiv geladenen Lysin in der 2. Ektodomäne, sind nicht ausschließlich in der apikalen Plasmamembran lokalisiert. Eine Erklärung für die unspezifische Lokalisation der Chimären I-P und II könnte auch das Fehlen jeglichen Sortierungssignales sein. Diese Möglichkeit ergibt sich, wenn Glutamat an Position 314* Teil des basolateralen Signals der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 wäre. In diesem Fall würde dieses Signal nach dem Austausch des Glutamats durch Lysin bei den entsprechenden Konstrukten verändert worden sein. Die Ergebnisse von Muth, die später noch erläutert werden (54), würden zumindest die Lokalisierung dieses möglichen basolateralen Signals im N-Terminus stützen, doch sprechen viele Überlegungen gegen eine herausragende Rolle des Glutamats₃₁₄ bei der basolateralen Sortierung der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 . Ohne spezifisches Sortierungssignal würde eine zufällige Proteinverteilung der Chimären I-P und II erfolgen. Mit großer Wahrscheinlichkeit wäre sogar der Transport zur Plasmamembran nicht mehr möglich und die Proteine würden intrazellulär akkumulieren. Dies kann bei den Chimären I-P und II aber nicht beobachtet werden.

Im Sequenzvergleich mit den anderen Isoformen der menschlichen Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 zeigt sich, dass Glutamat₃₁₄ in den entsprechenden Positionen (AS 312 bzw. AS 304) nicht konserviert ist (Abb. 4.2). Bisherige Untersuchungen an Transmembranproteinen haben gezeigt, dass basolaterale Signale vorwiegend in zytoplasmatischen und apikale eher in extrazellulären oder transmembranären Proteindomänen zu finden sind. Diese Beobachtung würde die zweite Ektodomäne von ATP1A1 als Ort für ein apikales Signal wahrscheinlicher werden lassen, wohingegen das basolaterale Sortierungssignal der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 vermutlich anders lokalisiert ist. Für die Na⁺,K⁺-ATPase scheinen besonders zytoplasmatische Domänen (2.,3.,4.,5. ZD) eine Rolle bei der Polarisierung zu spielen. Hier liegen u.a. die Bindungsstellen für das Ankyringerüst. Ankyrin ist im Zusammenspiel mit Spektrin und Aktin ein wichtiger Faktor für die Proteinstabilisierung in der Plasmamembran. Die Dissoziation des Spektrin-Ankyrin-Komplexes führt daher zum Polaritätsverlust der Na⁺,K⁺-ATPase (55; 76; 81). Muth hat 1998 durch eine Na,K-H,K-ATPase-Chimäre die basolaterale Sortierungsinformation auf den N-Terminus begrenzen können (54). Diese Chimäre besaß 519 n-terminale Aminosäuren der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 , die mit 500 c-terminalen der gastrischen H⁺,K⁺-ATPase- α basolateral sortiert wurde. So ist auch das apikale Signal der gastrischen H⁺,K⁺-ATPase- α in der 4. TMD entfernt worden (26). Dennoch spricht die eindeutige Lokalisierung dieser Chimäre in der basolateralen Plasmamembran für ein vorhandenes spezifisches Sortierungssignal. Dieses könnte mit Blick auf die hier vorliegenden Ergebnisse in dem Bereich zwischen AS 348 (siehe Chimäre II, bei der dieser Bereich der Na⁺,K⁺-ATPase durch die entsprechende ATP1A1 Sequenz ersetzt wurde) und AS 519 weiter eingegrenzt werden.

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Lokalisierung der Chimären I-P und II in der apikalen und basolateralen Membran wäre daher, dass, zusätzlich zu einem apikalen Signal, in diesen Konstrukten konkurrierende basolaterale Signale existieren (z.B. zwischen AS 348 und 519).

Trotz dieser Überlegungen kann nicht definitiv eine Beteiligung des Glutamats₃₁₄ bei der basolateralen Sortierung der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 ausgeschlossen werden. Bei dieser Frage könnten letztendlich zwei weitere Punktmutationen weiterhelfen, bei denen eine beliebige ungeladene und eine andere auch negativ geladene Aminosäure anstatt Glutamat in die Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 -Sequenz eingebaut werden. So könnte auch die Relevanz der negativen elektrischen Ladung des Glutamats untersucht werden.

Ebenso könnte mit Lysin verfahren werden, um seine Rolle bei der apikalen Sortierung zu testen. Es ließe sich so zeigen, ob die Aminosäuren selbst spezifisch für die

Sortierung sind, oder ob es vielmehr ihre elektrische Eigenschaften sind, die das Sortierungsverhalten des Proteins beeinflussen.

4.5 Die Funktion des gefundenen Sortierungssignals von ATP1AL1

Viele Untersuchungen an Proteinen haben den großen Effekt von Punktmutationen belegt. Für eine Ca-ATPase wurde gezeigt, dass sie nach einer Punktmutation nicht mehr zur Plasmamembran transportiert wird (38). Eine Variante der zystischen Fibrose entsteht durch eine Punktmutation, die zum Ausbleiben der Membranintegration des CFTR-Kanals führt (17). Es lassen sich viele weitere solcher Beispiele anführen, welche die besondere Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Sortierung hervorheben. Dennoch waren die Ergebnisse der Punktmutationen an den Chimären I und II überraschend, da sie an identischen Positionen durchgeführt wurden und in beiden Fällen die Proteinverteilung verändern konnten, und zwar in umgekehrter Weise.

Es stellt sich hier die Frage, wie diese Mutation der ersten Aminosäure der 2. Ektodomäne auf die Sortierung des ganzen Proteins wirken konnte. Sowohl Lysin als auch Glutamat sind elektrisch geladen. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 liegt Lysin positiv (pK 10,4) und Glutamat negativ (pK 4,3) geladen vor. Betrachtet man die ganze 2. Ektodomäne (Abb. 4.2, Seite 63, Anhang I), die aus insgesamt 6 AS besteht, fällt nur eine weitere geladene AS auf. Es ist die sechste, die bei ATP1AL1 und der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 ebenfalls negativ geladen ist. Bei ATP1AL1 ist es Aspartat (D₃₃₄, pK 3,9), bei Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 findet sich wieder Glutamat (E, 319). Eine positive und eine negative Ladung bestimmen somit das elektrische Muster der 2. Ektodomäne bei ATP1AL1, während bei der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 zwei negativ geladene Glutamate an den entsprechenden Positionen vorkommen. Diese Ladungsmuster finden sich auch bei den Chimären und ihren Punktmutanten. Alle untersuchten Proteine mit zwei negativen Ladungen in diesem Bereich sind ausschließlich basolateral lokalisiert, alle mit einer positiven und einer negativen Ladung sind jedoch auch in der apikalen Membran zu finden (Tab. 4.1).

Da die sechste Aminosäure der 2. Ektodomäne nicht verändert wurde, ist nicht geklärt, ob sie alleine im Zusammenspiel mit der ersten Aminosäure dieser Struktur ein Sortierungssignal bildet. Sicher ist, dass zwischen diesen Aminosäuren eine elektrische Wechselwirkung aufgrund der engen Nachbarschaft existiert. Das positiv geladene Lysin kann mit dem negativ geladenen Glutamat bzw. Aspartat in der 2.

Ektodomäne eine Salzbrücke ausbilden und so die Proteinkonformation beeinflussen. Solch eine Wechselwirkung zwischen Lysin und Glutamat ist bei einem *E.coli*-Protein belegt (56). Das Signal hätte somit eine Sekundär- oder Tertiärstruktur. Auch können Interaktionen dieser Struktur mit anderen Proteinbereichen eine Rolle spielen, die in der Sequenz weiter entfernt liegen. Diese könnten das potentielle apikale Signal der Chimären I-P und II komplettieren, denen durch ihre großen Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 -Anteile (992 bzw. 709 AS) evtl. wichtige Bereiche fehlen. Möglich sind z.B elektrische Wechselwirkungen der ersten Aminosäure der 2. ED mit anderen geladenen Aminosäuren in den extrazellulären Proteindomänen. Die Chimären I-P und II werden somit vielleicht aufgrund eines unvollständigen Signals neben der apikalen auch in der basolateralen Membran lokalisiert.

Beim vesikulären Transport von Transmembranproteinen liegen extrazelluläre Domänen intravesikulär vor. Daher ist es unwahrscheinlich, dass dieses mögliche Signal in der 2. ED über spezifische Adapterproteine wirkt, die mit zytosolischen Proteindomänen interagieren und so häufig basolateralen Transport vermitteln. Wahrscheinlicher bleibt also eine Beeinflussung der Sekundär- oder gar Tertiärstruktur des Proteins. Diese könnte ebenso zur Freigabe eines Sortierungssignals führen, das nicht in unmittelbarer Nachbarschaft liegt.

Auffällig ist auch, dass die gastrische H⁺,K⁺-ATPase- α nicht ein solches Ladungsmuster in der 2. Ektodomäne besitzt, was weiter ihren, von ATP1AL1 unterschiedlichen, apikalen Sortierungsmechanismus belegt. Wie aber auch bei ihr vermutet wird, besteht das apikale Signal aus der Wechselwirkung mehrerer Proteinbereiche, von denen die 4. TMD sehr wichtig ist (26). So muss wahrscheinlich auch bei ATP1AL1 von mehreren Bereichen ausgegangen werden, die erst in Zusammenarbeit die Ionenpumpe eindeutig in der Plasmamembran polarisieren.

4.6 Die Rolle der β -Untereinheit

ATP1AL1, wie auch GFP-ATP1AL1, wurden immer zusammen mit der β -Untereinheit der gastrischen H⁺,K⁺-ATPase der Ratte in MDCK-Zellen transfiziert. Wie schon in der Einleitung erörtert, ist diese für die Proteinausschleusung aus dem ER essentiell. Ohne die Heterodimerisierung mit der β -Untereinheit wird die α -Untereinheit im ER retiniert und degradiert. Die gastrische H⁺,K⁺-ATPase- β zeigt dabei die stärkste Wechselwirkung mit ATP1AL1 und wurde daher schon für viele Studien verwendet. Die Chimären wurden allerdings nicht kotransfiziert, da sie im C-Terminus die Bindungsstellen

für die endogene Na^+, K^+ -ATPase- β besitzen und mit dieser ein Heterodimer bilden können. Die β -Untereinheit besitzt kein dominantes Signal für die apikale Sortierung. Einzeln transfiziert, wird die gastrische H^+, K^+ -ATPase- β in die basolaterale Membran integriert. Wechselwirkungen mit anderen β -Untereinheiten wie der Na^+, K^+ -ATPase- β_1 , wurden ebenfalls schon beschrieben, doch auch ihre Sortierungssignale verhalten sich rezessiv. Eine für ATP1AL1 spezifische β -Untereinheit konnte bis dato nicht nachgewiesen werden.

4.7 Die Rolle des Zytoskeletts

Auf Glas gezüchtete Zellen sind nur begrenzt zur Erforschung von Polarität und Sortierung geeignet, da sie sich auf der undurchlässigen Glasoberfläche nicht vollständig polarisieren können. In dieser Arbeit wurden sie nur zur in vivo Darstellung von GFP-ATP1AL1 benutzt, wenn vollständige Polarität nicht notwendig war. So konnten mit ihnen einfach und schnell Versuche mit GFP-ATP1AL1 durchgeführt werden. Die in vivo Mikroskopie war um vieles umständlicher, wenn auf Filter gewachsene Zellen benutzt wurden. In diesem Fall mussten die Zellen auf der Filterunterseite angezüchtet werden. Der Filter konnte dann so in einer Inkubationskammer platziert werden, dass sich nur ein dünner Kulturmediumfilm zwischen dem Zellrasen und dem Glas befand. Der durch das Kulturmedium vergrößerte Abstand zum Objektiv erlaubte jedoch nur geringere Vergrößerungen.

Glas wurde auf verschiedene Weisen beschichtet (Kollagen Typ IV, Gelatine, Poly-L-Lysin). Die einzelnen Beschichtungen zeigten für die Polarität und Sortierung von ATP1AL1 keine Relevanz. Es zeigte sich, dass nach ca. 6 h Natriumbutyratstimulation (10 mM) erste sichtbare Proteinexpression stattfindet. Diese tritt zunächst nur in einzelnen Zellen auf. Nach 12 h exprimieren alle transfizierten Zellen. Während des Transports zur Membran ist ATP1AL1 nicht diffus intrazellulär verteilt, sondern scheint an zytoskelettalen Strukturen gebunden zu sein.

In den Experimenten mit der MT-zerstörenden Substanz Nokodazol zeigte sich GFP-ATP1AL1 in beiden Membrandomänen. Darüber hinaus konnte es intrazellulär akkumuliert nachgewiesen werden und schien auch nicht mehr an zytoskelettalen Strukturen gebunden zu sein. Dies ist ein wichtiger Anhalt für einen MT-assoziierten Transport von ATP1AL1 zu seiner Zielmembran. Es wurden auf beschichtetem Glas und auf Filtern angezüchtete MDCK-Zellen für Nokodazol-Versuche verwendet.

MDCK-Zellen, die auf beschichtetem Glas gezüchtet wurden, exprimieren die nicht gastrische H^+,K^+ -ATPase in der gesamten Membran. Man weiß, dass die Polarität von diesen Zellen nicht die hohe Differenzierung von Filterzellen erreichen kann. Ein Unterschied in Zellform und -größe ist schon lichtmikroskopisch zu erkennen. Ein Faktor ist dabei das MT-Gerüst, das bei auf beschichteten Glasoberflächen angezüchteten Zellen ein auf den ersten Blick ungeordnet erscheinendes Netzwerk bildet. Die auch polar orientierten MT sind hier vom Kern zur gesamten Zellmembran hin ausgerichtet. Auf Filter gewachsene Zellen zeigen gegenüber diesem perinukleären Muster ein weit höher orientiertes MT-System, das von basal nach apikal verläuft. Sowohl der direkte als auch der indirekte Transportweg zur apikalen Membran macht sich diese organisierte Struktur zu Nutze (45;50). Zerstört man sie jedoch durch Inkubation mit Nokodazol, ist die Membranexpression von ATP1AL1 auch in Filterzellen stark eingeschränkt. Das Protein, welches die Zellmembran noch erreicht, ist nicht mehr spezifisch auf die apikale Membran begrenzt. Ein großer Teil befindet sich dagegen auch basolateral und intrazellulär. Sicher spielt auch der Verlust von Polarität durch Zerstörung der MT eine große Rolle (83). Beweisend für eine tatsächliche Assoziation von ATP1AL1 mit dem MT-Gerüst wäre daher nur die eindeutige Kolo-kalisation. Dies gestaltet sich jedoch aufgrund der starken und ungleichmäßigen Proteinexpression nach Stimulation mit Natriumbutyrat als schwierig.

4.8 Der Transportweg von ATP1AL1

Dass ATP1AL1 nach Zerstörung des Mikrotubulsystems auch intrazellulär und in der basolateralen Membran zu finden ist, könnte auch ein Hinweis für die Transzytose des Proteins sein. Nach Endozytose würden nur noch geringe Proteinmengen die apikale Membran erreichen und stattdessen, ohne die Bindung an Mikrotubuli, unspezifisch intrazellulär akkumulieren. ATP1AL1 könnte so nur uneffizient von der basolateralen Membran zur apikalen Ziellmembran transportiert werden, was die mit GFP-ATP1AL1 beobachtete Verteilung nach Nokodazolbehandlung erklären könnte.

MDCK-Zellen benutzen zwar vorherrschend den direkten Transport (12), für die Transzytose von ATP1AL1 könnte jedoch weiter die uneindeutige Lokalisation der Chimären I-P und II sprechen. Sie könnten aufgrund ihres Na^+,K^+ -ATPase-Anteils in der basolateralen Membran z.T. verankert werden, so dass das apikale „Transzytose-Signal“ dann nur noch einen schwächeren Effekt hätte. Es müsste mit der basolateralen Verankerung konkurrieren. Die Spekulation über den Transportweg kann definitiv nur durch radioaktiv markiertes Protein in einem „pulse-chase-Experiment“ geklärt werden.

Ein indirekter Hinweis für Transzytose wäre jedoch die apikale Polarisierung von ATP1AL1 nach erneuter Mikrotubuliregeneration. Diese Versuche wurden nicht weiter betrieben, da zuerst die Neusynthese von Protein blockiert werden muss, um es vom umverteilten Protein unterscheiden zu können. Der lange Beobachtungszeitraum erschwert dabei erheblich die in vivo-Mikroskopie, da die Autofluoreszenz des GFP ausbleicht und so Proteinmengen nicht mehr sicher quantifiziert werden können.

4.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Insgesamt belegen die gewonnenen Daten die herausragende Rolle der 2. Ektodomäne für die apikale Sortierung von ATP1AL1. Diese Domäne könnte im Zusammenspiel mit anderen Proteinbereichen im C-Terminus wesentlich die Proteinkonformation beeinflussen. Wahrscheinlich ist die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Lysin₃₂₉ und Aspartat₃₃₄ Bestandteil des Adressierungssignals. Ein bestimmter Grad der Zelldifferenzierung ist dabei Voraussetzung für die strikte apikale Verteilung von ATP1AL1. Sowohl auf Filter polarisierte Zellen als auch ein intaktes Mikrotubuligerüst waren in den Experimenten für die Polarisierung der Ionenpumpe notwendig.

GFP-ATP1AL1 hat sich als ein geeignetes Werkzeug herausgestellt, um die menschliche nicht gastrische H⁺,K⁺-ATPase in transfizierten Zellen auch in vivo zu studieren. In allen untersuchten Aspekten (Heterodimerisierung mit der kotransfizierten gH,K-β, Funktion, Sortierung, Endozytose nach PKC-Aktivierung) wurden zu ATP1AL1 identische Resultate gefunden. Die Dynamik der Sortierung konnte so in vivo demonstriert werden. Mögliche Partner für das gefundene Signal könnten spezifisch blockiert werden, um dann ihren Effekt auf die Sortierung z.B. mit GFP-ATP1AL1 zu testen, wie es bereits mit dem Mikrotubuligerüst geschehen ist. Die Verwendung von GFP-ATP1AL1 würde auch bei anderen in vivo Experimenten, beispielsweise zur Injektion in Oozyten, nützlich sein. So könnte die Regulation dieser wichtigen Ionenpumpe auch an anderen Zellmodellen getestet werden.

Um die Chimärenergebnisse auf ATP1AL1 und die Na⁺,K⁺-ATPase-α₁ definitiv zu übertragen, müssten hier die gleichen Punktmutationen eingefügt werden. Würden sich hier die Ergebnisse bestätigen lassen, wovon in Hinblick auf Chimäre I und I-P, zumindestens bei der Na⁺,K⁺-ATPase-α₁ ausgegangen werden kann, wäre der Beweis für die herausragende Rolle der Aminosäure Lysin in der zweiten Ektodomäne für die apikale Sortierung erbracht. Ideal wäre es, das putative Signal in ein Protein zu

integrieren, das kein anderes Sortierungssignal besitzt. So könnten störende Effekte durch andere noch unbekanntes Sortierungssignale ausgeschlossen werden, mit denen bei dieser Chimärenstrategie leider immer gerechnet werden musste. Durch Transfektion einer weiteren Zelllinie mit den Chimären ließe sich untersuchen, ob das gefundene Signal spezifisch für MDCK-Zellen ist oder auch von anderen Epithelzelltypen erkannt wird. Die Ergebnisse könnten auch als Modell für weitere apikale Proteine dienen.

Sortierungssignale sind kleine Bausteine, denen in der Gesamtarchitektur der Zelle eine große Bedeutung zukommt. Letztendlich entsteht die komplexe Struktur „Zelle“ durch die Selbstorganisation ihrer zahlreichen Bestandteile. Sortierungssignale übernehmen bei diesem Prozess eine Schlüsselstellung. Ihre bisherige Identifikation hat einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulations- und Organisationsvorgänge in der Zelle geleistet. Ihre weitere Erforschung wird zur Beantwortung vieler noch offener Fragen in der Zellphysiologie beitragen können.

Literaturverzeichnis

1. Adams, G., Tillekeratne, M., Yu, C., Pestov, N. B., and Modyanov, N. N. Catalytic Function of Nongastric H,K-ATPase Expressed in Sf-21 Insect Cells. *Biochemistry* 15-5-2001;40(19):5765-76.
2. Amara, A. and Littman, D. R. After Hrs With HIV. *J.Cell Biol.* 4-8-2003;162(3):371-5.
3. Ameen, N. A. and Salas, P. J. Microvillus Inclusion Disease: a Genetic Defect Affecting Apical Membrane Protein Traffic in Intestinal Epithelium. *Traffic.* 2000;1(1):76-83.
4. Apell, H. J. Structure-Function Relationship in P-Type ATPases-a Biophysical Approach. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 2003;150(1):1-35.
5. Arystarkhova, E., Gibbons, D. L., and Sweadner, K. J. Topology of the Na,K-ATPase. Evidence for Externalization of a Labile Transmembrane Structure During Heating. *J.Biol.Chem.* 14-4-1995;270(15):8785-96.
6. Avner, E. D., Sweeney, W. E., Jr., and Nelson, W. J. Abnormal Sodium Pump Distribution During Renal Tubulogenesis in Congenital Murine Polycystic Kidney Disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 15-8-1992;89(16):7447-51.
7. Bastani, B. Colocalization of H-ATPase and H,K-ATPase Immunoreactivity in the Rat Kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995;5(7):1476-82.
8. Birnboim, H. C. and Doly, J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24-11-1979;7(6):1513-23.
9. Blanco, G. and Mercer, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in Structure, Diversity in Function. *Am.J.Physiol* 1998;275(5 Pt 2):F633-F650.
10. Blobel, G. and Dobberstein, B. Transfer of Proteins Across Membranes. I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma. *J.Cell Biol.* 1975;67(3):835-51.
11. Blobel, G. and Dobberstein, B. Transfer to Proteins Across Membranes. II. Reconstitution of Functional Rough Microsomes From Heterologous Components. *J.Cell Biol.* 1975;67(3):852-62.
12. Brown, D. and Breton, S. Sorting Proteins to Their Target Membranes. *Kidney Int.* 2000;57(3):816-24.
13. Brown, D. and Waneck, G. L. Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1992;3(4):895-906.

14. Brown, D. A. and London, E. Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1998;14:111-36.
15. Caplan, M. J. How Megalin Finds Its Way: Identification of a Novel Apical Sorting Motif. Focus on "Identification of an Apical Sorting Determinant in the Cytoplasmic Tail of Megalin". *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2003;284(5):C1101-C1104.
16. Carafoli, E. P-type ATPases. Introduction. 24(3)-245-7. 1992.
Ref Type: Generic
17. Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O'Riordan, C. R., and Smith, A. E. Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell* 16-11-1990;63(4):827-34.
18. Codina, J., Kone, B. C., Delmas-Mata, J. T., and Dubose, T. D., Jr. Functional Expression of the Colonic H⁺,K⁺-ATPase Alpha-Subunit. Pharmacologic Properties and Assembly With X⁺,K⁺-ATPase Beta-Subunits. *J.Biol.Chem.* 22-11-1996;271(47):29759-63.
19. Cougnon, M., Bouyer, P., Jaisser, F., Edelman, A., and Planelles, G. Ammonium Transport by the Colonic H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Am.J.Physiol* 1999;277(2 Pt 1):C280-C287.
20. Cougnon, M., Bouyer, P., Planelles, G., and Jaisser, F. Does the Colonic H,K-ATPase Also Act As an Na,K-ATPase? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 26-5-1998;95(11):6516-20.
21. Crambert, G., Horisberger, J. D., Modyanov, N. N., and Geering, K. Human Nongastric H⁺-K⁺-ATPase: Transport Properties of ATP1a1 Assembled With Different Beta-Subunits. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2002;283(1):C305-C314.
22. Devonald, M. A., Smith, A. N., Poon, J. P., Ihrke, G., and Karet, F. E. Non-Polarized Targeting of AE1 Causes Autosomal Dominant Distal Renal Tubular Acidosis. *Nat.Genet.* 2003;33(2):125-7.
23. Dieckmann-Schuppert, A. and Schnittler, H. J. A Simple Assay for Quantification of Protein in Tissue Sections, Cell Cultures, and Cell Homogenates, and of Protein Immobilized on Solid Surfaces. *Cell Tissue Res.* 1997;288(1):119-26.
24. Doctor, R. B., Chen, J., Peters, L. L., Lux, S. E., and Mandel, L. J. Distribution of Epithelial Ankyrin (Ank3) Spliceforms in Renal Proximal and Distal Tubules. *Am.J.Physiol* 1998;274(1 Pt 2):F129-F138.
25. Drenckhahn, D., Jons, T., Kollert-Jons, A., Koob, R., Kraemer, D., and Wagner, S. Cytoskeleton and Epithelial Polarity. *Ren Physiol Biochem.* 1993;16(1-2):6-14.

26. Dunbar, L. A., Aronson, P., and Caplan, M. J. A Transmembrane Segment Determines the Steady-State Localization of an Ion-Transporting Adenosine Triphosphatase. *J.Cell Biol.* 21-2-2000;148(4):769-78.
27. Eilers, U., Klumperman, J., and Hauri, H. P. Nocodazole, a Microtubule-Active Drug, Interferes With Apical Protein Delivery in Cultured Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *J.Cell Biol.* 1989;108(1):13-22.
28. Forbes, J. R. and Cox, D. W. Copper-Dependent Trafficking of Wilson Disease Mutant ATP7B Proteins. *Hum.Mol.Genet.* 12-8-2000;9(13):1927-35.
29. Geering, K. The Functional Role of Beta Subunits in Oligomeric P-Type ATPases. *J.Bioenerg.Biomembr.* 2001;33(5):425-38.
30. Geering, K., Crambert, G., Yu, C., Korneenko, T. V., Pestov, N. B., and Modyanov, N. N. Intersubunit Interactions in Human X,K-ATPases: Role of Membrane Domains M9 and M10 in the Assembly Process and Association Efficiency of Human, Nongastric H,K-ATPase Alpha Subunits (ATP1a1) With Known Beta Subunits. *Biochemistry* 17-10-2000;39(41):12688-98.
31. Giebisch, G., Hebert, S. C., and Wang, W. H. New Aspects of Renal Potassium Transport. *Pflugers Arch.* 2003;446(3):289-97.
32. Glynn, P. A. and Evans, T. J. Role of the PDZ Scaffolding Protein in Tubule Cells in Maintenance of Polarised Function. *Exp.Nephrol.* 2002;10(5-6):307-12.
33. Gottardi, C. J., Dunbar, L. A., and Caplan, M. J. Biotinylation and Assessment of Membrane Polarity: Caveats and Methodological Concerns. *Am.J.Physiol* 1995;268(2 Pt 2):F285-F295.
34. Grishin, A. V., Bevensee, M. O., Modyanov, N. N., Rajendran, V., Boron, W. F., and Caplan, M. J. Functional Expression of the cDNA Encoded by the Human ATP1AL1 Gene. *Am.J.Physiol* 1996;271(3 Pt 2):F539-F551.
35. Grishin, A. V. and Caplan, M. J. ATP1AL1, a Member of the Non-Gastric H,K-ATPase Family, Functions As a Sodium Pump. *J.Biol.Chem.* 23-10-1998;273(43):27772-8.
36. Grishin, A. V., Reinhard, J., Dunbar, L. A., Courtois-Coutry, N., Wang, T., Giebisch, G., and Caplan, M. J. Nongastric H⁺,K⁺-ATPase: Cell Biologic and Functional Properties. *Semin.Nephrol.* 1999;19(5):421-30.
37. Gu, F., Crump, C. M., and Thomas, G. Trans-Golgi Network Sorting. *Cell Mol.Life Sci.* 2001;58(8):1067-84.
38. Guerini, D., Zecca-Mazza, A., and Carafoli, E. Single Amino Acid Mutations in Transmembrane Domain 5 Confer to the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Properties Typical of the Ca²⁺ Pump of Endo(Sarco)Plasmic Reticulum. *J.Biol.Chem.* 6-10-2000;275(40):31361-8.

39. Gundersen, D., Orłowski, J., and Rodriguez-Boulan, E. Apical Polarity of Na,K-ATPase in Retinal Pigment Epithelium Is Linked to a Reversal of the Ankyrin-Fodrin Submembrane Cytoskeleton. *J.Cell Biol.* 1991;112(5):863-72.
40. Hartz, P. A. and Wilson, P. D. Functional Defects in Lysosomal Enzymes in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD): Abnormalities in Synthesis, Molecular Processing, Polarity, and Secretion. *Biochem.Mol.Med.* 1997;60(1):8-26.
41. Hillen, W., Klein, R. D., and Wells, R. D. Preparation of Milligram Amounts of 21 Deoxyribonucleic Acid Restriction Fragments. *Biochemistry* 23-6-1981;20(13):3748-56.
42. Hiltunen, M., Mannermaa, A., Koivisto, A. M., Lehtovirta, M., Helisalmi, S., Ryyanen, M., Riekkinen, P., Sr., and Soinen, H. Linkage Disequilibrium in the 13q12 Region in Finnish Late Onset Alzheimer's Disease Patients. *Eur.J.Hum.Genet.* 1999;7(6):652-8.
43. Koivisto, U. M., Hubbard, A. L., and Mellman, I. A Novel Cellular Phenotype for Familial Hypercholesterolemia Due to a Defect in Polarized Targeting of LDL Receptor. *Cell* 1-6-2001;105(5):575-85.
44. Kraut, J. A., Helander, K. G., Helander, H. F., Iroezi, N. D., Marcus, E. A., and Sachs, G. Detection and Localization of H⁺-K⁺-ATPase Isoforms in Human Kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2001;281(4):F763-F768.
45. Lafont, F., Burkhardt, J. K., and Simons, K. Involvement of Microtubule Motors in Basolateral and Apical Transport in Kidney Cells. *Nature* 22-12-1994;372(6508):801-3.
46. Lemas, M. V., Hamrick, M., Takeyasu, K., and Fambrough, D. M. 26 Amino Acids of an Extracellular Domain of the Na,K-ATPase Alpha-Subunit Are Sufficient for Assembly With the Na,K-ATPase Beta-Subunit. *J.Biol.Chem.* 18-3-1994;269(11):8255-9.
47. Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K. R., Nogi, T., and Mercola, M. Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and Cell Membrane Potentials Comprise a Very Early Step in Left-Right Patterning. *Cell* 4-10-2002;111(1):77-89.
48. Lingrel, J. B. and Kuntzweiler, T. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J.Biol.Chem.* 5-8-1994;269(31):19659-62.
49. Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. P-Type ATPases. *Trends Biochem.Sci.* 1996;21(12):467.
50. Matter, K., Bucher, K., and Hauri, H. P. Microtubule Perturbation Retards Both the Direct and the Indirect Apical Pathway but Does Not Affect Sorting of Plasma Membrane Proteins in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *EMBO J.* 1990;9(10):3163-70.
51. Mense, M., Rajendran, V., Blostein, R., and Caplan, M. J. Extracellular Domains, Transmembrane Segments, and Intracellular Domains

- Interact to Determine the Cation Selectivity of Na,K- and Gastric H,K-ATPase. *Biochemistry* 6-8-2002;41(31):9803-12.
52. Modyanov, N. N., Mathews, P. M., Grishin, A. V., Beguin, P., Beggah, A. T., Rossier, B. C., Horisberger, J. D., and Geering, K. Human ATP1A1 Gene Encodes a Ouabain-Sensitive H-K-ATPase. *Am.J.Physiol* 1995;269(4 Pt 1):C992-C997.
 53. Morello, J. P. and Bichet, D. G. Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Annu.Rev.Physiol* 2001;63:607-30.
 54. Muth, T. R., Gottardi, C. J., Roush, D. L., and Caplan, M. J. A Basolateral Sorting Signal Is Encoded in the Alpha-Subunit of Na-K-ATPase. *Am.J.Physiol* 1998;274(3 Pt 1):C688-C696.
 55. Nelson, W. J. and Veshnock, P. J. Ankyrin Binding to (Na⁺ + K⁺)ATPase and Implications for the Organization of Membrane Domains in Polarized Cells. *Nature* 6-8-1987;328(6130):533-6.
 56. Onesti, S., Miller, A. D., and Brick, P. The Crystal Structure of the Lysyl-TRNA Synthetase (LysU) From *Escherichia Coli*. *Structure*. 15-2-1995;3(2):163-76.
 57. Palsson, R., Sharma, C. P., Kim, K., McLaughlin, M., Brown, D., and Arnaout, M. A. Characterization and Cell Distribution of Polycystin, the Product of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Gene 1. *Mol.Med.* 1996;2(6):702-11.
 58. Pestov, N. B., Korneenko, T. V., Adams, G., Tillekeratne, M., Shakhparonov, M. I., and Modyanov, N. N. Nongastric H-K-ATPase in Rodent Prostate: Lobe-Specific Expression and Apical Localization. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2002;282(4):C907-C916.
 59. Pestov, N. B., Romanova, L. G., Korneenko, T. V., Egorov, M. V., Kostina, M. B., Sverdlov, V. E., Askari, A., Shakhparonov, M. I., and Modyanov, N. N. Ouabain-Sensitive H,K-ATPase: Tissue-Specific Expression of the Mammalian Genes Encoding the Catalytic Alpha Subunit. *FEBS Lett.* 4-12-1998;440(3):320-4.
 60. Reinhardt, J., Golenhofen, N., Pongs, O., Oberleithner, H., and Schwab, A. Migrating Transformed MDCK Cells Are Able to Structurally Polarize a Voltage-Activated K⁺ Channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 28-4-1998;95(9):5378-82.
 61. Reinhardt, J., Grishin, A. V., Oberleithner, H., and Caplan, M. J. Differential Localization of Human Nongastric H(+)-K(+)-ATPase ATP1A1 in Polarized Renal Epithelial Cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2000;279(3):F417-F425.
 62. Reinhardt, J., Kosch, M., Lerner, M., Bertram, H., Lemke, D., and Oberleithner, H. Stimulation of Protein Kinase C Pathway Mediates Endocytosis of Human Nongastric H⁺-K⁺-ATPase, ATP1A1. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2002;283(2):F335-F343.

63. Rodriguez-Boulan, E. and Nelson, W. J. Morphogenesis of the Polarized Epithelial Cell Phenotype. *Science* 18-8-1989;245(4919):718-25.
64. Rossen, J. W., Horzinek, M. C., and Rottier, P. J. Coronavirus Infection of Polarized Epithelial Cells. *Trends Microbiol.* 1995;3(12):486-90.
65. Sabatini, S. and Kurtzman, N. A. Biochemical and Genetic Advances in Distal Renal Tubular Acidosis. *Semin.Nephrol.* 2001;21(2):94-106.
66. Sargiacomo, M., Lisanti, M., Graeve, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulan, E. Integral and Peripheral Protein Composition of the Apical and Basolateral Membrane Domains in MDCK Cells. *J.Membr.Biol.* 1989;107(3):277-86.
67. Saunders, C. and Limbird, L. E. Disruption of Microtubules Reveals Two Independent Apical Targeting Mechanisms for G-Protein-Coupled Receptors in Polarized Renal Epithelial Cells. *J.Biol.Chem.* 25-7-1997;272(30):19035-45.
68. Silver, R. B. and Soleimani, M. H⁺-K⁺-ATPases: Regulation and Role in Pathophysiological States. *Am.J.Physiol* 1999;276(6 Pt 2):F799-F811.
69. Simons, K. and Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* 5-6-1997;387(6633):569-72.
70. Simons, K. and van Meer, G. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry* 23-8-1988;27(17):6197-202.
71. Simpson, A. M. and Schwartz, G. J. Distal Renal Tubular Acidosis With Severe Hypokalaemia, Probably Caused by Colonic H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase Deficiency. *Arch.Dis.Child* 2001;84(6):504-7.
72. Spicer, Z., Clarke, L. L., Gawenis, L. R., and Shull, G. E. Colonic H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase in K⁽⁺⁾ Conservation and Electrogenic Na⁽⁺⁾ Absorption During Na⁽⁺⁾ Restriction. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2001;281(6):G1369-G1377.
73. Spodsberg, N., Jacob, R., Alfalah, M., Zimmer, K. P., and Naim, H. Y. Molecular Basis of Aberrant Apical Protein Transport in an Intestinal Enzyme Disorder. *J.Biol.Chem.* 29-6-2001;276(26):23506-10.
74. Su, J. H., Deng, G., and Cotman, C. W. Transneuronal Degeneration in the Spread of Alzheimer's Disease Pathology: Immunohistochemical Evidence for the Transmission of Tau Hyperphosphorylation. *Neurobiol.Dis.* 1997;4(5):365-75.
75. Takahashi, Y., Sakai, H., Kuragari, M., Suzuki, T., Tauchi, K., Minamimura, T., Tsukada, K., Asano, S., and Takeguchi, N. Expression of ATP1A1, a Non-Gastric Proton Pump, in Human Colorectum. *Jpn.J.Physiol* 2002;52(3):317-21.
76. Thevananther, S., Kolli, A. H., and Devarajan, P. Identification of a Novel Ankyrin Isoform (AnkG190) in Kidney and Lung That Associates With

- the Plasma Membrane and Binds Alpha-Na, K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 11-9-1998;273(37):23952-8.
77. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. Crystal Structure of the Calcium Pump of Sarcoplasmic Reticulum at 2.6 Å Resolution. *Nature* 8-6-2000;405(6787):647-55.
78. van Balkom, B. W., van Raak, M., Breton, S., Pastor-Soler, N., Bouley, R., van der Sluijs P., Brown, D., and Deen, P. M. Hypertonicity Is Involved in Redirecting the Aquaporin-2 Water Channel into the Basolateral, Instead of the Apical, Plasma Membrane of Renal Epithelial Cells. *J.Biol.Chem.* 10-1-2003;278(2):1101-7.
79. van Zeijl, M. J. and Matlin, K. S. Microtubule Perturbation Inhibits Intracellular Transport of an Apical Membrane Glycoprotein in a Substrate-Dependent Manner in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Cell Regul.* 1990;1(12):921-36.
80. Wang, S. G. and Farley, R. A. Valine 904, Tyrosine 898, and Cysteine 908 in Na,K-ATPase Alpha Subunits Are Important for Assembly With Beta Subunits. *J.Biol.Chem.* 6-11-1998;273(45):29400-5.
81. Woroniecki, R., Ferdinand, J. R., Morrow, J. S., and Devarajan, P. Dissociation of Spectrin-Ankyrin Complex As a Basis for Loss of Na-K-ATPase Polarity After Ischemia. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2003;284(2):F358-F364.
82. Yang-Feng, T. L., Schneider, J. W., Lindgren, V., Shull, M. M., Benz, E. J., Jr., Lingrel, J. B., and Francke, U. Chromosomal Localization of Human Na⁺, K⁺-ATPase a. *Genomics* 1988;2(2):128-38.
83. Yap, A. S. and Manley, S. W. Microtubule Integrity Is Essential for Apical Polarization and Epithelial Morphogenesis in the Thyroid. *Cell Motil.Cytoskeleton* 2001;48(3):201-12.

6. Anhang

6.1 Aminosäure- und DNA- Sequenzen

ATP1AL1

ATP1AL1-Aminosäure-Sequenz (1039 AS), die putativen Transmembrandomänen (TM1-10) sind grau hinterlegt:

```

1  MHQKTPEIYS VELSGTKDIV KTDKGDGKEK YRGLKNNCLE LKKKNHKEEF
51  QKELHLDDHK LSNRELEEKY GTDIIMGLSS TRAAELLARD GPNSLTPPKQ
      TM1
101 TPEIVKFLKQ MVGGFSILLW VGAFLCWIAY GIQYSSDKSA SLNNVYLGCV
      TM2
151 LGLVVILTGI FAYYQEAQST NIMSSFNKMI PQQALVIRDS EKKTIPSEQL
201 VVGDIVVVKG GDQIPADIRV LSSQGCRVDN SSLTGESEPQ PRSSEFTHEN
251 PLETKNICFY STTCLEGTVT GMVINTGDRT IIGHIASLAS GVGNEKTPIA
      TM3 TM4
301 IEIEHFVHIV AGVAVSIGIL FFIIAVSLKY QVLDSIIFLI GIIVANVPEG
351 LLATVTVTLS LTAKRMAKKN CLVKNLEAVE TLGSTSIICS DKTGTTLTQNR
401 MTVAHLWFDN QIFVADTSED HSNQVFDQSS RTWASLSKII TLCNRAEFKP
451 GQENVPIMKK AVIGDASETA LLKFSEVILG DVMEIRKRNK KVAEIPFNST
501 NKFQLSIHEM DDPHGKRFLM VMKGAPERIL EKCSTIMING EEHPLDKSTA
551 KTFHTAYMEL GGLGERVLGF CHLYLPADEF PETYSFDIDA MNFPTSNLCF
601 VGLLSMIDPP RSTVPAVTK CRSAGIKVIM VTGDHPITAK AIAKSVGIIS
651 ANSETVEDIA HRLNIAVEQV NKRDAKAAVV TGMELKDMSS EQLDEILANY
701 QEIVFARTSP QQKLIIVEGC QRQDAVVAVT GDGVNDSPAL KKADIGIAMG
      TM5
751 IAGSDAAKNA ADMVLLDDNF ASIVTGVEEG RLIFDNLKKT IAYSLTKNIA
      TM6
801 ELCPFLEYII VGLPLPIGTI TILFIDLGTD IIPSIALAYE KAESDIMNRK
      TM7
851 PRHKNKDRLV NQPLAVYSYL HIGLMQALGA FLVYFTVYAO EGFLPRTLIN
      TM8
901 LRVEWEKDYV NDLKDSYGQE WTRYQREYLE WTGYTAFFVG ILVQQIADLI
      TM9
951 IRKTRNSIF QQGLFRNKVI WVGITSQIII GLILSYGLGS VTALSFTMLR
      TM10
1001 AQYWFVAVPH AILIWVYDEV RKLFIIRLYPG SWWDKNMYY

```

ATP1A1-DNA-Sequenz, Leserahmen: 168 – 3284 (3117 bp)

```

1   CGGCCGCGGA GGTGCGTGCA GGGCCCGCGC CGCCGCCGGT ATCTCCACCG
51  CCAACACCTC AGCCACTGCC ACTGCCACAG CCACACGAGG CCCCCACCG
101 TGCGCTCCGC CGCTGCGGTC CCGGATCCGC GCTCCACGCC CGCAGCCCGC
151 GGCGCCACCA GCCCAGCATG CACCAGAAAA CCCCAGAAAT TTACTCCGTG
201 GAGCTCAGCG GAACTAAGGA CATCGTGAAA ACAGACAAGG GGGATGGCAA
251 GGAGAAGTAT AGGGGTCTGA AGAACAACTG CCTGGAACTC AAAAAGAAAA
301 ATCACAAAGA GGAGTTTCAG AAAGAACTCC ATCTGGATGA CCACAAACTC
351 AGCAATAGGG AATTGGAAGA GAAATATGGC ACAGACATCA TTATGGGTCT
401 CTCCAGCACC AGAGCTGCCG AGCTCCTGGC CCGGGATGGG CCCAACTCCC
451 TCACCCCTCC CAAGCAGACG CCTGAGATCG TCAAGTTCCT CAAGCAGATG
501 GTGGGGGGGT TCTCTATCCT CCTGTGGGTG GGCGCCTTTC TCTGTTGGAT
551 TGCATATGGG ATTCAGTACT CCAGCGACAA GTCTGCATCC CTGAACAACG
601 TGTACTTGGG CTGTGTGCTT GGTCTGGTGG TCATTTTAAC GGGGATCTTT
651 GCTTATTACC AAGAGGCAAA AAGCACCAAC ATCATGTCCA GCTTCAATAA
701 GATGATCCCT CAGCAAGCTC TCGTCATCCG AGATTCCGAG AAGAAGACCA
751 TCCCTTCAGA GCAGCTGGTG GTGGGGGACA TTGTGGAGGT CAAAGGAGGA
801 GACCAGATCC CTGCAGACAT CAGGGTGCTG TCTTCTCAGG GGTGTCGGGT
851 GGATAACTCA TCTCTCACGG GGGAGTCTGA GCCCCAGCCC CGCTCCTCTG
901 AGTTTACCCA TGAAAACCCC CTGGAAACAA AGAACATCTG CTTCTATTCC
951 ACAACGTGTC TGGAAGGCAC TGTCACCGGC ATGGTTATCA ACACGGGTGA
1001 CCGCACCATC ATTGGCCATA TTGCCTCATT GGCCTCAGGA GTTGGAAATG
1051 AGAAGACGCC CATTGCCATT GAGATCGAGC ACTTTGTTCA CATTGTGGCA
1101 GGAGTGGCTG TCTCCATCGG CATCCTTTTC TTCATCATCG CTGTGTCCCT
1151 GAAGTATCAA GTCCTGGACT CCATCATCTT CCTCATTGGC ATCATTGTGG
1201 CCAATGTGCC CGAGGGCCTC CTGGCCACTG TCACTGTGAC CCTGTCCGCTG
1251 ACAGCAAAAC GGATGGCCAA GAAGAACTGC CTGGTGAAGA ACCTGGAGGC
1301 TGTGGAGACC CTCGGCTCCA CCTCCATCAT CTGCTCGGAC AAGACTGGGA
1351 CACTGACCCA GAACAGGATG ACAGTGGCCC ATCTGTGGTT CGACAATCAG
1401 ATCTTTGTGG CTGACACCAG TGAGGACCAT TCAAACCAAG TCTTTGACCA
1451 AAGCTCTAGG ACTTGGGCCT CTTATCCAA GATAATAACA TTGTGTAACC
1501 GAGCAGAGTT CAAGCCAGGA CAGGAAAATG TCCCCATCAT GAAGAAAGCT
1551 GTGATTGGAG ATGCCTCAGA AACTGCTCTT TAAAATTCT CAGAGGTCAT
1601 TTTGGGTGAT GTGATGGAAA TTAGAAAAAG AAACCGCAA GTAGCTGAAA
1651 TCCCTTTTAA CTCTACTAAT AAATTTCAGC TCTCCATCCA CGAGATGGAT
1701 GACCCCCACG GCAAGCGCTT CCTCATGGTG ATGAAGGGGG CCCCTGAGCG
1751 CATTCTAGAG AAATGCAGCA CCATCATGAT CAACGGCGAG GAGCACCCCAC
1801 TGGACAAGAG CACTGCCAAG ACCTTCCACA CAGCTACAT GGAGCTGGGC
1851 GGGTTGGGCG AGCGTGTGCT GGGTTTCTGT CATCTCTACC TGCCAGCAGA
1901 CGAGTTTCCA GAAACCTACT CATTTGACAT AGACGCTATG AACTTTCCGA
1951 CCTCCAACCT CTGTTTTGTG GGACTCTTGT CAATGATCGA TCCCCTCGG
2001 TCCACCGTGC CAGATGCAGT CACCAAAATGC CGGAGTGCAG GGATCAAGGT
2051 TATTATGGTT ACTGGTGATC ATCCCATCAC AGCCAAAGCT ATTGCCAAGA
2101 GTGTGGGGAT CATTTCAGCC AACAGTGAAA CAGTGGAGA CATTGCACAT
2151 CGCCTCAACA TTGCTGTGGA GCAAGTTAAC AAACGGGATG CCAAGGCCGC
2201 TGTGGTGACT GGCATGGAGC TGAAGGACAT GAGCTCAGAA CAGCTGGATG
2251 AGATCTTAGC CAACTACCAG GAGATTGTCT TTGCCCGGAC ATCCCCCAG
2301 CAGAAGCTGA TCATTGTGGA GGGCTGTCAG AGGCAGGATG CTGTTGTTGC
2351 TGTGACCGGG GATGGAGTTA ATGACTCTCC GGCTCTAAAG AAGGCAGACA
2401 TTGGGATTGC CATGGGGATA GCAGGTTCTG ATGCAGCCAA AAATGCAGCC
2451 GACATGGTCT TGCTGGACGA CAACTTCGCA TCCATCGTCA CAGGGGTGGA
2501 GGAAGGTCGC CTGATCTTTG ACAACCTCAA GAAGACTATT GCTTATTCCC

```

```

2551 TGACCAAGAA CATTGCCGAG CTGTGCCCCCT TTCTGATCTA CATCATTGTC
2601 GGGCTCCCCC TGCCCATTGG CACCATCACC ATTCTGTTCA TTGACTTGGG
2651 GACAGACATT ATCCCCTCCA TTGCCCTGGC GTACGAGAAA GCTGAAAGTG
2701 ACATCATGAA CAGGAAGCCT CGCCACAAGA ATAAGGACAG GCTGGTGAAC
2751 CAGCCGCTCG CTGTGTACTC ATACCTGCAC ATTGGCCTCA TGCAAGCCCT
2801 GGGAGCTTTC CTTGTGTATT TCACCGTCTA TGCACAAGAG GGCTTTCTGC
2851 CCCGCACTCT CATTAACTG CGGGTAGAAT GGGAGAAGGA CTACGTGAAT
2901 GACTTGAAAG ACAGCTATGG GCAGGAATGG ACAAGGTACC AGAGGGAATA
2951 CCTAGAATGG ACGGGCTACA CGGCTTTCTT TGTTGGCATC CTAGTCCAGC
3001 AAATAGCAGA TCTGATCATC AGGAAAACCC GGAGGAATTC CATCTTCCAG
3051 CAGGGTCTCT TCAGAAATAA AGTCATCTGG GTGGGGATCA CCTCACAGAT
3101 CATCATTGGT CTGATCCTCT CCTATGGCCT CGGAAGTGTC ACAGCCTTGA
3151 GTTTCACCAT GCTTAGGGCT CAGTACTGGT TTGTGGCTGT GCCGCACGCC
3201 ATCCTGATCT GGGTGTATGA TGAGGTGCGG AAGCTCTTCA TCAGGCTCTA
3251 CCCTGGAAGC TGGTGGGATA AGAACATGTA TTATTAAGAC CACCTCCCTT
3301 CCTATGTCTC TCAGCAGCAC GTTGGGGCAC ACTTGTTTCAT CTTCTGACCG
3351 TTTGCTGGGC TATTCCCCTG CAGTGCAGAC ATCGTCAAAA TTCATACAAG
3401 AGGAAATTTT CATGCAGAAA GCTGTATGCA GGATGCTCAC TGATGTTTTG
3451 CACTTTAAAA CTGAAATTCa ACTCTTTATA TAGGATTTTC TTTTCTATCT
3501 CCATCTCCTC ATTAAAAAAT ACGTACATTT CGAGGTAATG GTATA

```

Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 , Ratte

ATP1A1-AS-Sequenz (1023 AS), die putativen Transmembrandomänen (TM1-10) sind grau hinterlegt:

```

1  MGKGVGRDKY EPAAVSEQGD KKGKKGKKDR DMDELKKEVS MDDHKLSLDE
51  LHRKYGTDLS RGLTSARAAE ILARDGPNAL TPPPTTPEWI KFCRQLFGGF
    TM1 TM2
101 SMLLWIGAIL CFLAYSIQAA TEEEPQNDNL YLGVVLSAVV IITGCFsYYQ
151 EAKSSKIMES FKNMVPQQAL VIRNGEKMSI NAEEVVVVDL VEVKGGDRIP
201 ADLRIISANG CKVDNSSLTG ESEPQTRSPD FTNENPLETR NIAFFSTNCV
251 EGTARGIVVY TGDRTVMGRI ATLASGLEGG QTPIAAEIEH FIHIITGVAV
    TM3 TM4
301 FLGVSFFILS LILEYTWLEA VIFLIGIIVA NVPEGLLATV TVCLTLTAKR
351 MARKNCLVKN LEAVETLGST STICSDKTGT LTQNRMTVAH MWFDNQIHEA
401 DTTENQSGVS FDKTSATWLA LSRIAGLCNR AVFQANQENL PILKRAVAGD
451 ASESALLKCI ELCCGSVKEM RERYAKIVEI PFNSTNKYQL SIHKNPNTSE
501 PQHLLVMKGA PERILDRCSS ILLHGKEQPL DEELKDAFQN AYLELGGLGE
551 RVLGFCHLFL PDEQFPEGFQ FDTDDVNFPI DNLCFVGLIS MIDPPRAAVP

```


601 DAVGKCRSAG IKVIMVTGDH PITAKAIAKG VGIISEGNET VEDIAARLNI
 651 PVSQVNPRDA KACVVHGS DL KDMTSEQLDD ILKYHTEIVF ARTSPQQKLI
 701 IVEGCQRQGA IVAVTGDGVN DSPALKKADI GVAMGIAGSD VSKQAADMIL
 TM5
 751 LDDNFASIVT GVEEGRLIFD NLKKSIA~~YTL~~ TSN~~IP~~EITPF LIFIIANIPL
 TM6
 801 PLG~~TVTILCI~~ DLG~~TDMPAI~~ SLAYEQAESD IMKRQPRNPK TDKLVNERLI
 TM7
 851 ~~SMAYGQIGMI~~ QALGGFFTYF VILAENGFLP IHLLGLRVDW DDRWINDVED
 TM8
 901 SYGQQWTYEQ RKIVEFTCHT AFFVSIVVQ WADLVICKTR RNSVFQQGMK
 TM9 TM10
 951 NKILIFGLFE ETALAAFLSY CPGMGVALRM YPLKPTWWFC AFPYSLIFV
 1001 ~~YDEVRKLIIR~~ RPPGGWVEKE TYY

ATP1A1-DNA-Sequenz, Leserahmen: 238 – 3306 (3069 bp)

1 GGAGCCTCGG CGGGAGGAGG CGGACACGTG GCAGCGGCGG CGGCAGCGGC
 51 AGCAGCAGCG GCGGCAGCAG CGGCGGCCTC GGTCCGGGGC GCCGGCCGTC
 101 CTCCCTCTTT CCTCCGGCGG CAGCCCTAGT TCCCGCCTCT CGGCTCCCCC
 151 GGCTCCACTC TCCAGCCGG GAGCTGCTCT CTCTCTTTC TAGTCTCCAG
 201 CCACAGGACC CGGCGCGGGG CCCGCAGCGC CGCCACC**ATG** GGAAGGGGG
 251 TTGGACGAGA CAAGTATGAG CCCGCAGCTG TATCAGAACA TGGGGACAAG
 301 AAGAGCAAGA AGGCGAAGAA GGAAAGGGAC ATGGACGAAC TCAAGAAGGA
 351 AGTGTCTATG GACGACCATA AACTCAGCCT GGATGAACTC CATCGTAAAT
 401 ACGGAACAGA TTTGAGCCGA GGCCTAACAC CCGCAAGGGC CGCTGAGATC
 451 CTGGCTCGGG ATGGCCCCAA CGCCCTCACG CCCCCTCCA CTACTCCCGA
 501 GTGGGTCAAA TTCTGTTCGGC AGCTGTTTCGG TGGCTTCTCC ATGTTACTGT
 551 GGATTGGAGC CATTCTTTGT TTCTTGGCTT ATGGCATCCG AAGTGCTACA
 601 GAAGAGGAAC CACCAAATGA TGATCTGTAC CTCGGGGTCG TGCTGTCTGC
 651 TGTCGTCATC ATAACTGGCT GTTTCTCCTA TTATCAAGAA GCAAAAAGCT
 701 CCAAGATCAT GGAATCCTTC AAGAACATGG TCCCTCAGCA AGCCCTCGTG
 751 ATTCGAAATG GAGAGAAGAT GAGCATCAAC GCAGAGGATG TCGTCGTTGG
 801 TGATCTGGTG GAGGTGAAGG GCGGAGACCG AATCCCTGCT GATCTCAGAA
 851 TCATATCTGC AAATGGCTGC AAGGTGGATA ACTCCTCACT CACTGGTGAA
 901 TCAGAACCCC AGACTCGGTC CCCGGATTTT ACAAACGAGA ACCCCTGGA
 951 GACAAGGAAC ATTGCCCTCT TCTCAACCAA CTGTGTTGAA GGAAGTGCAC
 1001 GTGGCATCGT TGTGTACACT GGGGATCGCA CCGTGATGGG CAGGATCGCC
 1051 ACCCTTGCTT CTGGGCTGGA AGGCGGCCAG ACCCCATTG CTGAAGAAAT
 1101 CGAGCACTTC ATCCACCTCA TCACGGGTGT GGCCGTGTTT CTGGGGGTGT
 1151 CTTTCTTCAT TCTCTCTCTG ATCCTT**GAGT** ACACCTGGCT **CGAGGCTGTC**
 1201 ATCTTCCTCA TTGGTATCAT CGTAGCCAAC GTGCCGGAAG GTTTGCTGGC
 1251 CACCGTCACG GTATGTCTGA **CGCTCACTGC** CAAGCGCATG GCGAGGAAGA
 1301 ACTGCCTGGT GAAGAACCTG GAAGCTGTGG AGACCTTGGG GTCCACATCC
 1351 ACCATCTGCT CCGACAAGAC TGGAACCTCTG ACTCAGAACC GGATGACAGT
 1401 GGCTCACATG TGGTTTGACA ATCAAATCCA TGAAGCTGAC ACCACAGAGA
 1451 ATCAGAGTGG GGTCTCCTTT GACAAGACGT CAGCCACCTG GTTCGCTCTG
 1501 TCCAGAATTG CTGGTCTCTG TAACAGGGCA GTGTTTCAGG CTAACCAAGA
 1551 AAACCTGCCT ATCCTTAAGC GTGCAGTAGC GGGAGATGCT TCCGAGTCGG

1601 CGCTCTTAAA GTGCATCGAG GTCTGCTGTG GCTCCGTGAT GGAGATGAGG
1651 GAGAAGTACA CCAAGATAGT GGAGATTCCT TTCAACTCCA CCAACAAGTA
1701 CCAGCTCTCC ATTCACAAGA ACCCAAACGC ATCGGAGCCT AAGCACCTGC
1751 TAGTGATGAA GGGCGCCCCA GAAAGGATCC TGGACCGATG CAGTTCTATC
1801 CTCCTCCACG GCAAGGAGCA GCCCCTGGAC GAAGAGCTGA AGGACGCCTT
1851 TCAGAATGCC TACCTAGAGC TGGGGGGCCT TGGAGAGCGT GTGCTAGGTT
1901 TCTGCCACCT CTTTCTGCCT GACGAACAGT TTCCCGAAGG CTTCAGTTT
1951 GACACTGATG AAGTCAATTT CCCCGTGGAT AACCTCTGCT TCGTGGGTCT
2001 TATCTCCATG ATTGACCCTC CTCGAGCTGC TGTCCCGAT GCTGTGGGCA
2051 AATGCCGCAG CGCTGGGATT AAGGTCATCA TGGTCACAGG AGACCATCCA
2101 ATCACAGCCA AAGCCATTGC TAAGGGGGTG GGCATTATCT CAGAAGGTAA
2151 CGAGACCGTG GAAGACATTG CTGCCCGCCT CAACATTCCA GTGAACCAGG
2201 TGAACCCAG AGATGCCAAG GCCTGTGTAG TACATGGCAG TGACTTGAAG
2251 GACATGACCT CTGAGGAGCT GGATGACATT TTGCGGTACC ACACGGAGAT
2301 TGTCTTTGCT AGGACCTCTC CTCAACAGAA GCTCATCATT GTGGAGGGCT
2351 GCCAGCGGCA GGGTGCCATC GTGGCTGTCA CAGGGGATGG TGTCAATGAC
2401 TCTCCAGCTT TGAAAAAGGC AGATATTGGG GTTGCCATGG GGATTGTTGG
2451 CTCGGATGTG TCCAAGCAAG CTGCTGACAT GATTCTTCTG GATGACAAC
2501 TTGCCTCCAT CGTGACTGGA GTAGAAGAAG GTCGTCTGAT ATTTGATAAC
2551 TTGAAGAAAT CCATTGCTTA CACCCTAACA AGTAACATTC CGGAAATCAC
2601 CCCCTTCTTG ATATTTATTA TTGCAAACAT TCCACTGCCC CTGGGCACCG
2651 TGACCATCCT CTGCATTGAC TTGGGCACTG ACATGGTTCC CGCCATCTCT
2701 CTGGCCTATG AACAGGCTGA AAGTGACATC ATGAAGAGGC AGCCAGAAA
2751 TCCAAAACG GACAAACTTG TGAACGAGCG TCTGATCAGC ATGGCCTATG
2801 GACAGATCGG TATGATCCAG GCCCTGGGAG GCTTCTTCAC TTATTTTGTG
2851 ATTCTGGCTG AGAACGGTTT CCTGCCCTTT CACCTGTTGG GCATCCGAGA
2901 GACCTGGGAT GACCGCTGGA TCAATGATGT GGAGGACAGC TACGGGCAGC
2951 AGTGGACCTA CGAGCAGAGG AAGATTGTGG AGTTCACCTG CCACACGGCC
3001 TTCTTTGTCA GTATCGTGGT AGTGCAGTGG GCTGACTTGG TCATCTGCAA
3051 GACCAGAAGG AATTCTGTCT TCCAGCAGGG AATGAAGAAC AAGATCTTAA
3101 TATTTGGCCT CTTTGAAGAG ACAGCTCTTG CTGCTTTCCT GTCCACTGC
3151 CCTGGGATGG GTGCAGCCCT TAGGATGTAT CCCCTCAAAC CTACTTGGTG
3201 GTTCTGTGCC TTCCCCTACT CCCTTCTCAT CTTCTGTGAT GACGAGGTGC
3251 GGAAGCTCAT CATCAGGCGA CGCCCTGGCG GCTGGGTGGA GAAGGAAACC
3301 TACTACTAGC CCACTGCCCT GCACGCCGTG GAACATTGTG CCACACACTG
3351 CACCTACCCC TACCCCCCT TTGTGTACTT CAAGTCTTGG AGCTCGGAAC
3401 TCTACCCTGG TAGGAAAGCA CCAAAGCATG TGGGGATCCA GACGTCCTGG
3451 AATGAAGCAT GTAGCTGTAA TGGGGGCGG GGGGAGGGCT GCCCGAAAAA
3501 CACCGTGGAC GGGGACGACA GCGGGGAAGG TTTATATGTG CCTTTTTGTT
3551 TTTGTAAAAA AGGAAAACCT GGAAAGACTG AAAGATTACG TTTTATATCT
3601 GGATTTTTAC AAATAAAGAT GGCTATTATA ACGGAA

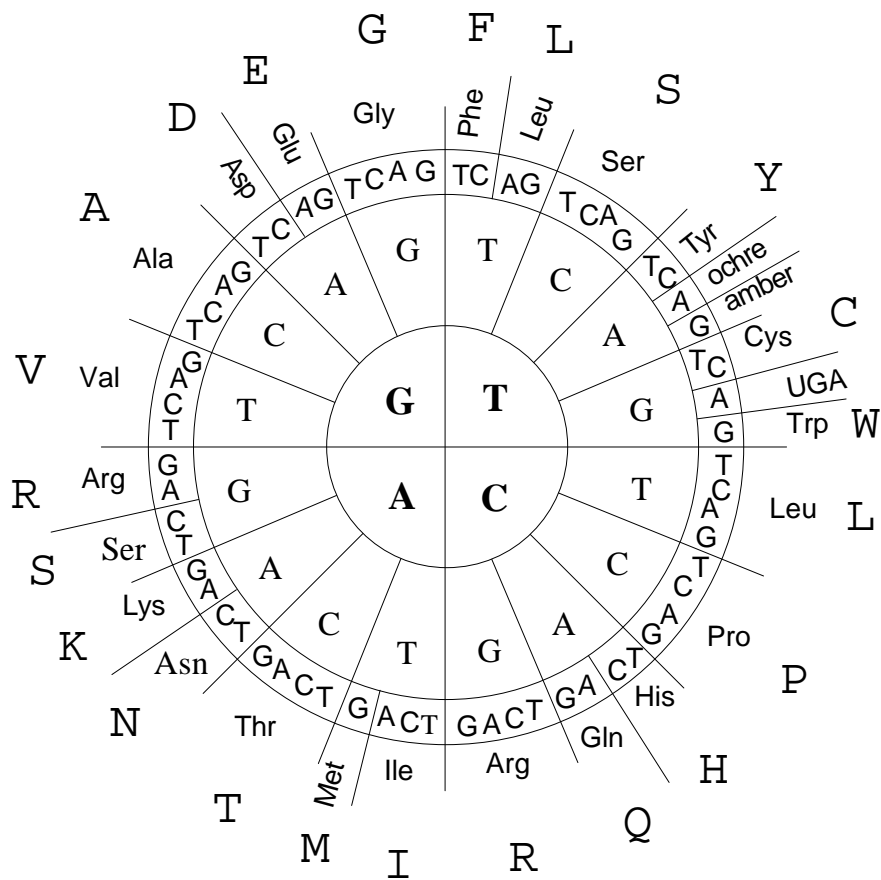
6.2 Membrantopologie

Die angegebene Membrantopologie basiert auf mehreren Strukturanalysen von P-Typ-ATPasen (3, 7, 63) und entspricht wahrscheinlich sehr gut der tatsächlichen Topologie von ATP1AL1 und der Na⁺,K⁺-ATPase- α_1 , die hier gegenübergestellt sind.

Domäne	Aminosäurepositionen	
	ATP1AL1 (ng H ⁺ ,K ⁺ -ATPase- α)	ATP1A1 (Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase- α_1)
N-terminal		
ID 1	1-110 (110 AS)	1-95 (95 AS)
TMD 1	111-132 (22 AS)	96-117 (22 AS)
ED 1	133-144 (12 AS)	118-129 (12 AS)
TMD 2	145-162 (18 AS)	130-147 (18 AS)
ID 2	163-305 (43 AS)	148-290 (43 AS)
TMD 3	306-328 (23 AS)	291-313 (23 AS)
ED 2	329-334 (6 AS)	314-319 (6 AS)
TMD 4	335-363 (29 AS)	320-348 (29 AS)
ID 3	364-792 (428 AS)	349-777 (428 AS)
TMD 5	793-813 (21 AS)	778-798 (21 AS)
ED 3	814-818 (5 AS)	799-803 (5 AS)
TMD 6	819-839 (21 AS)	804-824 (21 AS)
ID 4	840-863 (24 AS)	825-848 (24 AS)
TMD 7	864-887 (24 AS)	849-872 (24 AS)
ED 4	888-930 (43 AS)	873-915 (43 AS)
TMD 8	931-951 (21 AS)	916-936 (21 AS)
ID 5	952-968 (17 AS)	937-952 (16 AS)
TMD 9	969-993 (25 AS)	953-977 (25 AS)
ED 5	994-997 (4 AS)	978-981 (4 AS)
TMD 10	998-1018 (21 AS)	982-1002 (21 AS)
ID 6	1019-1039 (21 AS)	1003-1023 (21 AS)
C-terminal		

6.3 AS-Uhr

Die Aminosäure-Uhr zeigt den ubiquitären 3-Buchstaben-Code aus den Nukleinsäuren Adenin, Guanin, Cytosin und Thymidin. Die Aminosäuren sind in 3-Letter- und 1-Letter-Schreibweise dargestellt.



6.4 Lebenslauf