

Aus dem Bereich 2.4 Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Regulation des TRPC4 Kationenkanals
Regulation of TRPC4 cation channels

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von: Franziska Meiser

geb. am: 01.09.1987 in Soltau

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Die Familie der TRP Ionenkanäle	6
2.1.1	TRPC-Kationenkanäle	8
2.1.2	Der TRPC4-Kationenkanal	9
2.2	Zielsetzung der Arbeit	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Material.....	14
3.1.1	Puffer, Lösungen und Medien	14
3.1.2	Organismen	20
3.1.3	Antikörper	21
3.1.4	Proteinmarker	23
3.1.5	Plasmide	23
3.1.6	Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme	25
3.1.7	Oligonukleotide	25
3.2	Methoden	27
3.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	27
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	29
3.2.3	Massenspektrometrische Analyse von TRPC4-Protein-Interaktionen.....	39
3.2.4	Untersuchung der TRPC4-Proteininteraktionen mithilfe von Glutathion-S- Transferase (GST) getaggtten Fusionsproteinen	42
3.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.6	Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels FURA-2.....	52
4	Ergebnisse	55

4.1	Auswahl geeigneter TRPC4-Antikörper	55
4.1.1	Untersuchung der Spezifität der verschiedenen TRPC4-Antikörper mithilfe des Western Blotting	55
4.2	Immunpräzipitation von TRPC4 und massenspektrometrische Identifizierung.....	60
4.2.1	Immunpräzipitation von TRPC4 aus mit bTRPC4 transfizierten COS-Zellen ..	61
4.2.2	Immunpräzipitation von TRPC4 aus Hirn von Maus.....	63
4.2.3	Immunpräzipitation von TRPC4 aus HEK bTRPC4 und SBAC	65
4.3	Massenspektrometrische Identifizierung putativer TRPC4-Interaktionspartner.....	66
4.3.1	Analyse der massenspektrometrischen Daten	66
4.3.2	Bestätigung der TRPC4-Interaktionen mit Fryl und Liprin-beta-1 durch Ko-Immunpräzipitationen	72
4.4	Klonierungsexperimente.....	74
4.4.1	Klonierung der cDNS von Liprin-beta-1 von Maus in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP.....	74
4.4.2	Klonierung der cDNS von Fryl von Maus in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP	79
4.5	Bestätigung und weitere Charakterisierung der Proteininteraktion zwischen TRPC4 und Fryl	87
4.5.1	Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Fryl aus transfizierten HEK293-Zellen	87
4.5.2	Lokalisierung der TRPC4-Fryl-Interaktion mithilfe von GST-Pulldown-Versuchen.....	89
4.5.3	Funktionelle Charakterisierung der TRPC4-Fryl-Interaktion – Einflusses der TRPC4-Fryl-Interaktion auf den Carbachol-induzierten Kalziumeinstrom.....	94
4.6	Bestätigung und weitere Charakterisierung der Proteininteraktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1.....	96
4.6.1	Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Liprin-beta-1 aus transfizierten HEK293-Zellen	96
4.6.2	Lokalisierung der TRPC4-Liprin-beta-1-Interaktion mithilfe von GST-Pulldown-Versuchen	97

4.6.3	Funktionelle Charakterisierung der TRPC4-Liprin-beta-1-Interaktion – Einfluss der TRPC4-Liprin-beta-1-Interaktion auf den Carbachol-induzierten Kalziueinstrom	99
5	Diskussion	102
5.1	Bewertung von Sensitivität und Spezifität TRPC4-spezifischer Antikörper	102
5.2	Anreicherung des TRPC4-Proteins unter verschiedenen Versuchsbedingungen....	104
5.3	Analyse der massenspektrometrischen Daten	106
5.3.1	Fryl als möglicher Interaktionspartner des TRPC4-Proteins	107
5.3.2	Liprin-beta-1 als möglicher Interaktionspartner des TRPC4-Proteins.....	110
6	Literaturverzeichnis.....	114
7	Anhang	120
7.1	Abbildungsverzeichnis	120
7.2	Tabellenverzeichnis	123
7.3	Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen	124
7.4	Danksagung	144
7.5	Lebenslauf	146

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
cm	Zentimeter
COS	Affennierenzellen
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HEK293	Human embryonic kidney cell 293 (humane Nierenzelllinie)
HEK mC4	stabil mit mTRPC4 transfizierte HEK293-Zellen
HEK bC4	stabil mit bTRPC4 transfizierte HEK293-Zellen
H ₂ O _{VE}	vollentsalztes Wasser

HPLC	High Performance-Liquid-Chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
IRES	„Internal ribosomal entry site“
kDa	Kilodalton
L	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid chromatography)
LAR	leucocyte common antigen-related
M	Molar
mA	Milliampere
MEM	Modifiziertes Eagle-Medium
mFryl	Fryl-Protein von Maus
mg	Milligramm
Min.	Minute
mLiprin-beta-1	Liprin-beta-1-Protein von Maus
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Penicillin/Streptomycin
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAM	sterile alpha motif

SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sek.	Sekunde
SP	Swiss-Prot
Std.	Stunde
SOC	store-operated channel (speicherregulierter Kanal)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TBST	mit Tween 20 versetztes TBS
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
V	Volt
v/v (%)	volume per volume
W	Watt
w/v (%)	weight per volume
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Zusammenfassung

Ca^{2+} ist ein intrazellulärer Botenstoff, der zahlreiche zelluläre Prozesse reguliert und moduliert. Eine Protein-Familie, die sich aus Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen zusammensetzt und an der Regulation von Ca^{2+} -Signalen in unterschiedlichen Zellen beteiligt ist, ist die TRP-Protein-Familie. Der TRPC4-Kationenkanal stellt einen der insgesamt 28 Vertreter dieser Protein-Familie dar. TRPC4 wird in verschiedensten Geweben exprimiert, darunter Hirn, Niere, Herz, Hoden, Endothel und glatter Muskulatur und trägt dort zur Übertragung Ca^{2+} -vermittelter Signale bei. Durch Studien an TRPC4-defizienten Maus-Modellen konnten bereits einige Funktionen dieses Kanalproteins identifiziert werden. So ist bekannt, dass TRPC4 in Endothelzellen für die Vasorelaxation und Permeabilitätssteigerung erforderlich ist oder in glatter Muskulatur des Gastrointestinaltraktes cholinerge Afferenzen moduliert. Um weitere Einblicke in die Funktion des TRPC4-Kanalproteins und dessen Regulationsmechanismus zu gewinnen, ist es notwendig Signalwege aufzudecken, in die TRPC4 eingebunden ist. Der erste Schritt hierbei ist die Identifizierung von interagierenden Proteinen.

In meiner Arbeit sollte daher TRPC4 mit daran assoziierten Proteinen mittels Ko-Immunpräzipitation angereichert werden und die aufgereinigten Proteine durch massenspektrometrische Analysen identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß, in dem TRPC4 und interagierende Proteine angereichert werden, abhängig vom präzipitierenden Antikörper, dem zur Aufreinigung eingesetzten Gewebe und dem verwendeten Detergens variiert. So konnte das TRPC4-Protein zusammen mit assoziierten Proteinen unter Verwendung von Digitonin spezifisch aus SBAC-Zellen, einer endogen TRPC4-exprimierenden Zelllinie der Nebennierenrinde des Rindes, und aus einer stabil mit TRPC4 transfizierten HEK293-Zelllinie solubilisiert und nur mithilfe von TRPC4-spezifischen Antikörpern angereichert und massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Bei den mitangereicherten Proteinen handelt es sich um putative TRPC4-Interaktionspartner. Unter diesen befanden sich das 340 kDa große Fryl-Protein und das 110 kDa große Liprin-beta-1. Die Funktion beider Proteine ist bis dato noch weitestgehend ungeklärt. Die Interaktion zwischen TRPC4 und den beiden genannten Proteinen wurde anschließend in unabhängigen Ko-Immunpräzipitationen bestätigt und mithilfe von GST-Pulldown-Versuchen der Carboxyterminus des TRPC4-Proteins als derjenige Abschnitt identifiziert, über den die

Wechselwirkung mit beiden Proteinen erfolgt. Um eine funktionelle Bedeutung der gefundenen Interaktionen auf die TRPC4-Kanalaktivität zu charakterisieren, wurden die cDNS des Fryl-Proteins und des Liprin-beta-1-Proteins von Maus kloniert. Die generierten Plasmide wurden anschließend zur Transfektion einer HEK293-Zelllinie eingesetzt, die bereits stabil das mTRPC4-Protein und den muskarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 2 heterolog exprimiert. Es wurde der Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in die Fryl-transfizierten bzw. Liprin-beta-1-transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen. Während sich nach Transfektion mit Liprin-beta-1 der TRPC4-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom nicht signifikant änderte, zeigten die Fryl-transfizierten Zellen einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom nach Carbachol-Stimulation. Die Wechselwirkung zwischen Fryl und TRPC4 könnte daher bedeutsam sein für die Ca^{2+} -Homöostase eines Zellsystems und die Modulation Ca^{2+} -vermittelter Signale.

Summary

Ca^{2+} is an intracellular secondary messenger which regulates and modulates numerous cellular processes. The family of TRP proteins is composed of Ca^{2+} permeable ion channels involved in the regulation of Ca^{2+} signals in different cells and tissues. The TRPC4 cation channel represents one of the 28 members of this protein family. TRPC4 is expressed in many different tissues amongst them brain, kidney, heart, testicle, endothelium and smooth muscle cells. There it contributes to the transmission of Ca^{2+} -mediated signals. By studying TRPC4 deficient mouse models some functions of this channel protein have already been identified. For example, it is known that TRPC4 is necessary for vasorelaxation and that it increases the permeability of vascular endothelial cells furthermore that it modulates cholinergic efferents in smooth muscle cells of the gastrointestinal tract. To gain further insight in the functions of TRPC4 and its regulatory mechanisms it is necessary to uncover signal cascades it participates in.

In my work TRPC4 and associated proteins were enriched by co-immunoprecipitation and the purified proteins were identified by massspectrometric analysis. It was shown that the degree in which TRPC4 and interacting proteins were enriched depended on the precipitating antibody and furthermore on the used tissue and detergent. By using the detergent digitonin for solubilization TRPC4 and associated proteins could be isolated from SBAC cells, an endogenously TRPC4 expressing cell line derived from the bovine adrenocortex, and from a stably TRPC4-expressing HEK293 cell line. Using TRPC4-specific antibodies TRPC4 could be enriched and identified by mass spectrometry. The identified proteins found together with TRPC4 represent putative interaction partners.

The 340 kDa protein Fryl and the 110 kDa protein Liprin-beta-1 belong to the identified putative TRPC4 interaction proteins. Their function however is yet unknown. The interaction between TRPC4 and the two proteins was confirmed by independent co-immunoprecipitations. By using GST-pulldown-assays the c-term of TRPC4 was identified as the interacting domain of TRPC4. To characterize the functional relevance of the protein interactions the murine cDNA of Fryl and Liprin-beta-1 was cloned. Afterwards the created plasmids were used to transfect a HEK293 cell line which stably expresses TRPC4 and the M_2 -receptor. Afterwards the carbachol-induced Ca^{2+} -current into Fryl and Liprin-beta-1 transfected cells was measured and compared to control cells. The TRPC4-mediated Ca^{2+} -current in Liprin-beta-1 transfected cells was not significantly changed while Fryl transfected

cells showed enhanced Ca^{2+} -currents after carbachol-stimulation. Hence the interaction between TRPC4 and the Fryl protein might be important for Ca^{2+} -homeostasis and the modulation of Ca^{2+} -mediated signals.

2 Einleitung

Kalzium ist ein ubiquitär vorkommender intrazellulärer Botenstoff, der eine Vielzahl an zellulären Prozessen reguliert. Vorgänge wie Muskelkontraktion, Sekretion, Zellproliferation und -differenzierung werden durch Kalziumsignale ausgelöst und moduliert (Tang et al. 2000). Dass ein einzelner Botenstoff eine solche Anzahl verschiedenster Prozesse beeinflussen kann, lässt sich durch die enorme Vielfältigkeit der Kalziumsignale erklären, die sich nicht nur in Amplitude und räumlicher Ausdehnung unterscheiden können, sondern auch bezüglich ihres zeitlichen Verlaufes variieren (Berridge et al. 2000). Verschiedenste molekulare Komponenten – von Berridge et al. als Werkzeugkasten bezeichnet - wirken hier zusammen und werden jeweils unterschiedlich kombiniert, um Kalziumsignale mit charakteristischen Verlaufsmustern zu generieren. Der Kalziumeinstrom ins Zytosol kann dabei aus zwei unterschiedlichen Quellen erfolgen. Zum einen kann Kalzium aus dem intrazellulären Kalziumspeicher, dem endoplasmatischen Retikulum, freigesetzt werden, zum anderen kann es aus dem Extrazellulärraum in die Zelle gelangen (Wu et al. 2002). In beiden Fällen sind Kalzium-leitende Ionenkanäle für den Transport erforderlich. Als Ionenkanäle bezeichnet man allgemein membrandurchspannende, porenformende Proteine, die den Transport von Ionen über die Plasmamembran hinweg ermöglichen (Mathie 2010). Je nach Aktivierungsmechanismus werden sie in spannungsabhängige Ionenkanäle und Ligandengesteuerte Ionenkanäle unterteilt. In nicht erregbaren Zellen setzen sich Agonisten-induzierte Ca^{2+} -Signale, die über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) verlaufen, aus zwei Phasen zusammen. Einer initialen zytosolischen Ca^{2+} -Erhöhung, die aus einem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum resultiert, folgt eine zweite Phase, in der Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol gelangt (Freichel et al. 1999). Die für diesen Ca^{2+} -Einstrom verantwortlichen Kanäle werden durch die Entleerung des endoplasmatischen Retikulums aktiviert und daher als “speicherregulierte Kanäle“ oder “store-operated channels“ (SOC) bezeichnet.

So wichtig das korrekte Zusammenspiel aller am Kalziumsignal beteiligten Komponenten ist, so fatal sind die Auswirkungen für den Organismus, wenn dieses fein abgestimmte Gefüge ins Ungleichgewicht gerät. Ob Alzheimer-Erkrankung (Riazantseva et al. 2012), chronisches Nierenversagen (Lajdova et al. 2012), Bluthochdruck oder Atherosklerose (Yang und Huang 1999) – viele der heute bedeutsamsten Erkrankungen gehen mit einer veränderten Kalzium-

Homöostase einher. Nicht verwunderlich ist es daher, dass viele der seit Jahren bewährten Arzneimittel versuchen an diesem Punkt in den Krankheitsprozess einzugreifen. Eine prominente Medikamenten-Gruppe sind beispielsweise die Kalziumantagonisten vom Dihydropyridin-Typ in der Behandlung von Bluthochdruck. Seit langem ist aber auch bekannt, dass Proteine - und somit auch Ionenkanäle - ihre Funktion nicht alleine ausüben, sondern Teil eines komplexen Netzwerkes an Protein-Interaktionen sind (Fares et al. 2011) und in diesem eng reguliert werden. Ziel der modernen Forschung muss es daher sein, Protein-Interaktionen und die damit verbundenen Signalwege näher zu charakterisieren, um so neue medikamentöse Ansätze zur Behandlung von Krankheiten aufzudecken.

Eine Protein-Familie, die sich aus verschiedenen unselektiven, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen zusammensetzt und daher an der Regulation des Kalziumhaushaltes von Zellsystemen und an der Modulierung von Kalziumsignalen entscheidend beteiligt sein könnte, ist die Familie der TRPC-Kanäle.

2.1 Die Familie der TRP Ionenkanäle

Die TRPC-Kanäle sind Teil der Superfamilie der TRP-Kationenkanäle (transient receptor potential). Erstmals beschrieben wurden diese in Photorezeptoren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*: Hier beobachteten Cosens und Manning 1969, dass die Photorezeptoren aus einer bestimmten *Drosophila*-Mutante nicht in der Lage dazu waren, auf einen konstanten Lichtreiz mit einem anhaltenden Rezeptorpotential zu antworten (Cosens und Manning 1969). Stattdessen wiesen sie ein transientes Potential auf mit einem deutlich verminderten Ca^{2+} -Einstrom. Erst 1989 konnte das ursächliche Gen, das in der *Drosophila*-Mutante veränderte war, identifiziert werden (Montell und Rubin 1989). Es kodierte für ein integrales Membranprotein, das entsprechend als "transient receptor potential" oder TRP-Protein bezeichnet wurde. Bis heute wurden in Säugern insgesamt 28 Gene gefunden, die für TRP-Proteine kodieren. Bekannt ist aber auch, dass verwandte Proteine in Fischen, Würmern und Fliegen exprimiert werden (Flockerzi 2007). Die einzelnen Vertreter der TRP-Familie unterscheiden sich deutlich hinsichtlich Funktion, Aktivierungsmechanismus und Kationenselektivität. Einziges verbindendes Merkmal ist ihr Aufbau aus sechs Transmembrandomänen und einer Poren-formenden Region zwischen Transmembrandomäne fünf und sechs. Weiterhin wird angenommen, dass alle TRP-Kanäle – ähnlich wie

spannungsaktivierte Kaliumkanäle (Yellen 2002) – in der Zellmembran tetramere Strukturen ausbilden, die sich entweder aus vier gleichartigen TRP-Proteinen (Homotetramere) oder aus unterschiedlichen TRP-Proteinen (Heterotetramere) zusammensetzen (Hofmann et al. 2002). Anhand ihrer Aminosäuresequenz werden die in Säugern vorkommenden TRP-Proteine in sechs Subfamilien eingeteilt: in die TRPC (klassische), die TRPV (Vanilloid-Rezeptor), die TRPM (Melastatin), die TRPML (Mucolipin), die TRPP (Polycystin) und die TRPA (Ankyrin) Kanäle. Die Vertreter einer siebten Subfamilie, der TRPN-Kanäle, konnten bisher in Säugern nicht identifiziert werden, sondern lediglich in Fliegen, Würmern und Manteltieren.

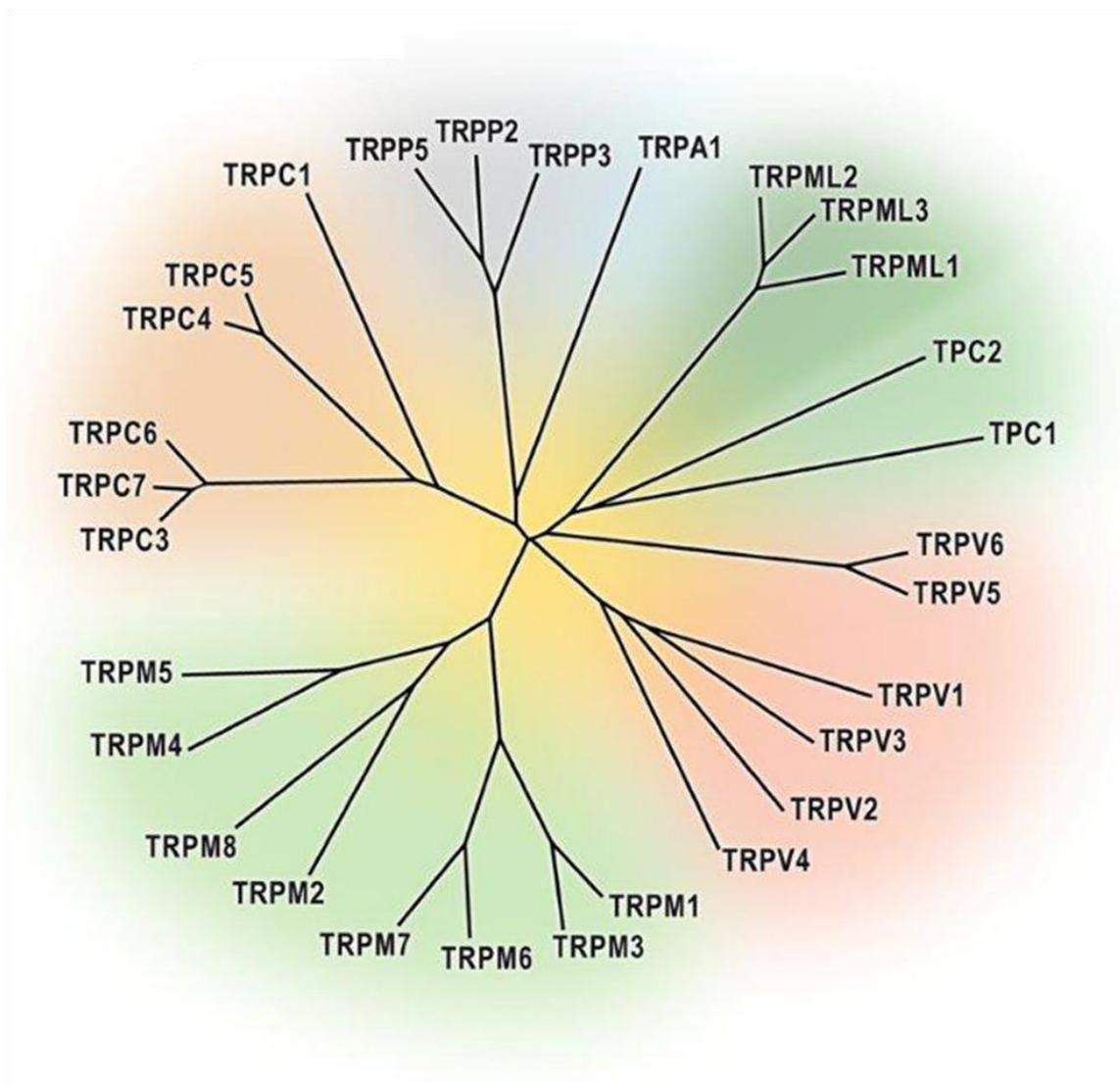


Abbildung 1: Stammbaum der in Säugern vorhandenen Vertreter der TRP-Proteinfamilie.

Zu sehen sind die sechs Subfamilien der in Säugern exprimierten TRP-Proteine mit ihren jeweiligen Vertretern: TRPC (klassisch), TRPV (Vanilloid-Rezeptor), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin) und TRPA (Ankyrin)

2.1.1 TRPC-Kationenkanäle

Die Subfamilie der TRPC-Kationenkanäle stellt eine der sieben Subfamilien der TRP-Kanäle dar. Sie umfasst sieben Vertreter, TRPC1 bis TRPC7. Im Menschen werden allerdings nur sechs dieser Proteine exprimiert, TRPC2 ist lediglich als Pseudogen angelegt (Wes et al. 1995). Die TRPC-Kanäle weisen unter allen bekannten TRP-Proteinen mit einer Sequenzhomologie von 30-40 % die größte Ähnlichkeit zu den ursprünglich in der Drosophila-Fliege identifizierten TRP-Proteinen auf (Ramsey et al. 2006), daher die Bezeichnung "classical". Anhand der Aminosäuresequenz werden die sieben Vertreter der TRPC-Subfamilie nochmals in drei Untergruppen unterteilt: TRPC1/4/5, TRPC2 und TRPC3/6/7. Um funktionelle Kanäle zu formen bilden die einzelnen TRPC-Proteine nicht nur Homotetramere aus, sondern die Vertreter der einzelnen Untergruppen scheinen sich auch zu heterotetrameren Proteinkomplexen zusammenlagern zu können (Hofmann et al. 2002).

Neben Strukturmerkmalen wie Ankyrin-reichen Abschnitten am N-Terminus und Prolin-reichen Sequenzen am C-Terminus gibt es vier Bereiche, die in allen TRPC-Proteinen hoch konserviert sind, die sogenannten Aminosäuremotive M1 bis M4. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Lage dieser vier Motive. M1 besteht aus 38 Aminosäuren die N-terminal zu der Transmembrandomäne 1 (TM1) liegen, M2 befindet sich in der cytosolisch gelegenen

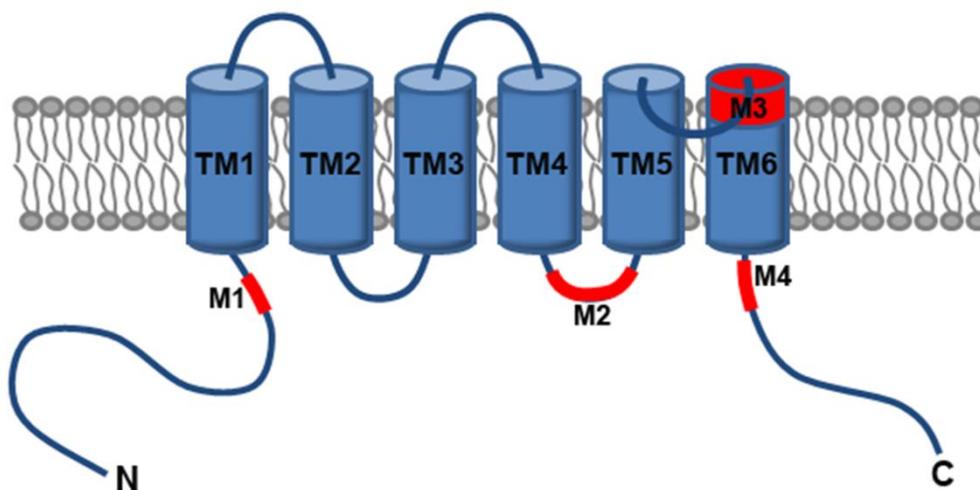


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der TRPC-Proteine mit Darstellung der konservierten Aminosäuremotive M1 bis M4.

Zu sehen ist der schematische Aufbau eines TRPC-Kanalproteins mit seinen 6 Transmembrandomänen (TM1-6). Sowohl N- als auch C-Terminus sind im Zytosol lokalisiert. Rot dargestellt sind die in allen TRPC-Proteinen hoch konservierten Aminosäuresequenzmotive M1-4.

Schleife zwischen Transmembrandomäne 4 (TM4) und 5 (TM5), M3 ist Teil der Transmembrandomäne 6 (TM6). M4, auch als TRP-Domäne bezeichnet, setzt sich aus 28 Aminosäuren zusammen, die in allen TRP-Proteinen, nicht nur der Subfamilie der TRPC-Kanäle, hoch konserviert vorliegen. Allen TRPC-Proteinen gemeinsam ist, dass sie unselektive, Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle bilden, an deren Aktivierung die Phospholipase C (PLC) beteiligt ist (Montell 2005). Im Detail sind die Aktivierungsmechanismen der sieben TRPC-Kanäle jedoch nicht endgültig geklärt. Sie scheinen je nach TRPC-Kanal und Zelltyp unterschiedlich reguliert zu sein. So gibt es Hinweise darauf, dass einige der TRPC-Kanäle durch die Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher aktiviert werden können und somit als "store-operated channels" (SOC) fungieren. Dieser Mechanismus wurde für TRPC1 (Zhu et al. 1996), TRPC4 (Philipp et al. 1996) und TRPC5 (Philipp et al. 1998) beschrieben, ist bis heute allerdings umstritten. TRPC3, TRPC6 und TRPC7 sollen durch Diacylglycerin (DAG), das nach Aktivierung der PLC gebildet wird, aktivierbar sein (Hofmann et al. 1999; Okada et al. 1999). Über den TRPC1-Kationenkanal wurde weiterhin postuliert, dass er mechanisch (Maroto et al. 2005) und über den TRPC5-Kanal, dass dieser nach EGF-Stimulation durch Translokation in die Plasmamembran aktiviert werden kann (Bezzarides et al. 2004). Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die TRPC-Kanäle durch verschiedene Signale aktiviert werden können, die abhängig vom untersuchten Zelltyp und von der Tetramierzusammensetzung des funktionellen Kationenkanals variieren (Putney 2005).

2.1.2 Der TRPC4-Kationenkanal

Das TRPC4-Protein gehört der Subfamilie der TRPC-Kationenkanäle an und bildet darin zusammen mit TRPC1 und TRPC5 eine der drei Untergruppen. Es wurde erstmals 1996 aus der Nebenniere von Rind kloniert (Philipp et al. 1996). Seither wurden orthologe Gene in weiteren Säugern wie Maus, Ratte und Mensch identifiziert. Die aus den jeweiligen Genen resultierenden Proteine weisen Größen von 974 AS (TRPC4 α Maus), 977 AS (TRPC4 α Ratte, TRPC4 α Mensch) und 979 AS (TRPC4 α Rind) auf und besitzen ein Molekulargewicht von etwa 110 kDa. Neben der erwähnten α -Variante wurden mehrere Splicevarianten des TRPC4-Proteins beschrieben (β , γ , δ , ϵ , ζ). Die β -Splicevariante wird neben der α -Variante am häufigsten exprimiert und unterscheidet sich von dieser durch das Fehlen eines 84 AS langen Bereiches am C-Terminus (Mery et al. 2001). Das TRPC4-Protein wird gewebespezifisch exprimiert. So wurde es in Plazenta-, Nebennierenrinden-, Herz- und Hirngewebe (v.a.

Hippocampus, Gyrus dentatus und Retina), weiterhin in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen (Venkatachalam und Montell 2007). Die Aktivierungsmechanismen scheinen abhängig vom betrachteten Gewebe zu variieren (Montell 2005).

2.1.2.1 Struktur des TRPC4-Kationenkanals und bekannte Interaktionsdomänen

TRPC4 fungiert als unselektiver, Ca^{2+} -permeabler Kationenkanal und zeigt einen für TRP-Kanäle typischen Aufbau, der durch sechs transmembranäre Domänen (TM1-6) und eine Poren-formende Region zwischen TM5 und TM6 gekennzeichnet ist. Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich im Zytosol. Um einen funktionellen Kanal zu bilden, lagern sich vier TRPC4-Proteine zu einem Homotetramer zusammen, TRPC4 kann aber auch durch Ausbildung von Proteinkomplexen mit TRPC1 und TRPC5 heterotetramere Strukturen formen (Hofmann et al. 2002). Neben den vier Aminosäuremotiven M1-4, die in allen TRPC-Proteinen konserviert sind, weist TRPC4 weitere typische Proteindomänen auf (Abbildung 10).

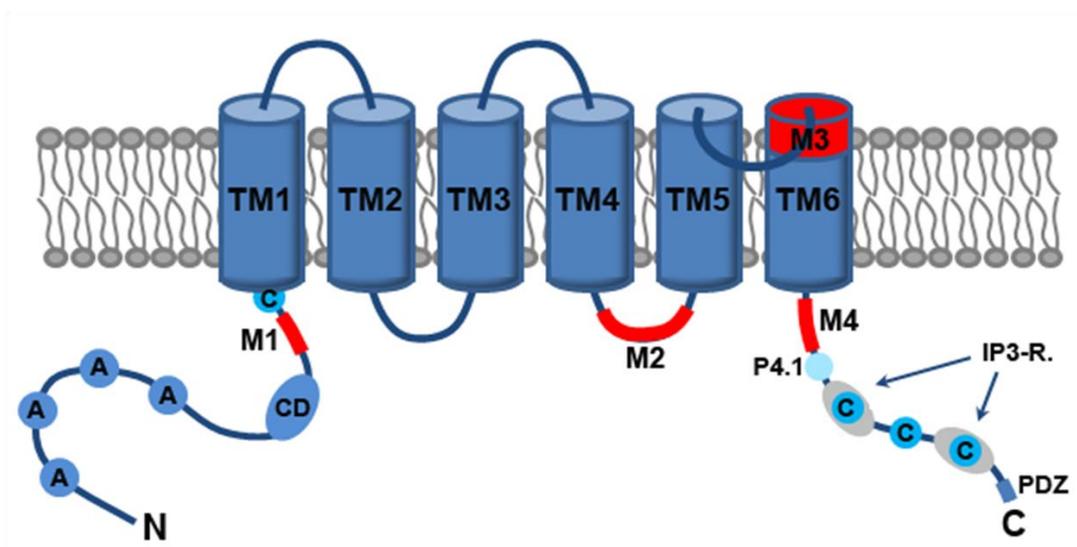


Abbildung 3: Schematische Darstellung des TRPC4-Kationenkanals.

Gezeigt ist der schematische Aufbau des TRPC4-Kationenkanals mit seinen sechs Transmembrandomänen (TM1-6), der Poren-formenden Region zwischen TM5 und TM6 und den cytosolisch lokalisierten N- und C-Termini. Das Protein weist die vier konservierten Aminosäuremotive M1-4 auf. N-terminal befinden sich vier Ankyrin-reiche Domänen (A) und eine Coiled-coil-Domäne (CD). Dargestellt sind auch die vier beschriebene Calmodulin-Bindungsstellen (C), die Interaktionsbereiche mit dem IP_3 -Rezeptor ($\text{IP}_3\text{-R.}$) und diejenige mit dem Protein 4.1 (P4.1). Weiterhin ist die am absoluten C-Terminus gelegene PDZ-Domäne (PDZ) markiert.

N-terminal befinden sich vier Ankyrin-reiche Domänen (A), was vermuten lässt, dass TRPC4 hier an einer Vielzahl an Protein-Interaktionen beteiligt ist. Weiterhin sind am N-Terminus

eine Coiled-coil-Domäne (CD) und eine der insgesamt vier Calmodulin-Bindungsstellen (C) zu finden. Drei weitere Calmodulin-Interaktionsbereiche des TRPC4-Proteins sind C-terminal lokalisiert (Trost et al. 2001) und überlappen teilweise mit Domänen, die auch mit dem IP₃-Rezeptor interagieren (Tang et al. 2001). Calmodulin bindet Ca²⁺-abhängig an diese Bereiche des TRPC4-Proteins (Trost et al. 2001) und scheint mit dem IP₃-Rezeptor um die Bindungsstellen zu konkurrieren (Tang et al. 2001). Der um 84 AS verkürzten β-Variante des TRPC4-Proteins fehlen die beiden C-terminal lokalisierten Calmodulin-Bindungsstellen. Entsprechend konnte eine Interaktion mit dem IP₃-Rezeptor für TRPC4β nicht nachgewiesen werden (Mery et al. 2001).

2005 wurde von Cioffi et al. eine Interaktion zwischen TRPC4 und Protein 4.1 beschrieben (Cioffi et al. 2005). Der identifizierte Interaktionsbereich ist in Abbildung 3 dargestellt (P4.1). Er befindet sich im C-Terminus des TRPC4-Proteins. Cioffi et al. konnten weiterhin zeigen, dass eine Deletion dieses Interaktionsbereiches zu einem veränderten speicherregulierten Ca²⁺-Einstrom in Endothelzellen aus Lungengewebe führt. Die Verbindung von TRPC4 mit dem Zytoskelett, die durch Protein 4.1 vermittelt wird, könnte daher die Funktion des TRPC4-Kanals maßgeblich beeinflussen.

Eine weitere Proteindomäne, die häufig an Protein-Interaktionen beteiligt ist und sowohl in TRPC4 als auch in TRPC5 nachgewiesen wurde, ist die am absoluten C-Terminus lokalisierte PDZ-Domäne (Abbildung 10). Über diese Domäne kann TRPC4 in Wechselwirkung mit dem NHERF-Protein (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor) treten (Tang et al. 2000). Dieses wiederum kann als Gerüstprotein zum einen eine Interaktion mit der Familie der Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)-Proteine vermitteln, die als Verbindungsproteine zwischen Membranrezeptoren und dem Aktin-Zytoskelett fungieren (Bretscher et al. 1997). Zum anderen kann NHERF aber auch mit der PLCβ interagieren, sodass hier eine mögliche Verknüpfung des TRPC4-Proteins mit der PLCβ geschaffen wird (Tang et al. 2000).

2.1.2.2 Bekannt Funktionen des TRPC-Kationenkanals

Anhand von Studien an TRPC4-defizienten Mäusen konnten verschiedene Prozesse identifiziert werden, an denen das TRPC4-Protein entscheidend beteiligt ist. Freichel et al. zeigten 2001, dass in den aus TRPC4-defizienten Mäusen isolierten Endothelzellen der speicherregulierte Ca²⁺-Einstrom (SOC) signifikant verringert ist und die betrachteten Gefäße eine verminderte stimulierte Vasorelaxation zeigten (Freichel et al. 2001). Ähnliches wurde von Tirupathi et al. in Lungenendothelzellen aus TRPC4-defizienten Mäusen beobachtet.

Auch hier wurde ein reduzierter speicherinduzierter Ca^{2+} -Einstrom auf bestimmte Stimuli (Thrombin, PAR-1-Agonist) gemessen, was in einer verminderten Erhöhung der Gefäßpermeabilität resultierte (Tiruppathi et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass TRPC4 in Endothelzellen als speicherregulierter Kanal (SOC) fungiert und dort an der korrekten Übermittlung von Ca^{2+} -Signalen entscheidend beteiligt ist.

Auch im zentralen Nervensystem (ZNS), speziell in sog. F2-Nervenendigungen von bestimmten Interneuronen des Thalamus, wurde eine funktionelle Bedeutung des TRPC4-Kanals nachgewiesen. Hier wurde beobachtet, dass die 5-Hydroxytryptamin (5-HT)-induzierte Erhöhung der γ -Aminobuttersäure (GABA)-Freisetzung in TRPC4-defizienten Mäusen deutlich reduziert war (Munsch et al. 2003). Hierdurch könnte TRPC4 bei der Verarbeitung visueller Informationen im Thalamus eine tragende Rolle spielen (Pape et al. 2004).

Weiterhin wurde beschrieben, dass TRPC4 in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und derjenigen in Gefäßwänden exprimiert wird (Walker et al. 2001). Durch Untersuchungen an glatten Muskelzellen, die aus TRPC4-defizienten Mäusen gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass TRPC4 hier wesentlich für den über muskarinische Acetylcholinrezeptoren vermittelten Kationen-Einstrom verantwortlich ist, der zu einer Depolarisation der Zellen führt, wodurch spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen. Letzteres führt zu einem massiven Ca^{2+} -Einstrom, der die Muskelkontraktion auslöst (Tsvilovskyy et al. 2009).

2.2 Zielsetzung der Arbeit

TRPC4 ist – wie oben beschrieben - in Endothelzellen und in glatter Muskulatur an der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes und der Vermittlung von Ca^{2+} -Signalen beteiligt und scheint darüber Einfluss auf den Mechanismus der Blutdruckregulation und die gastrointestinale Motilität nehmen zu können. Diese Funktionen machen den TRPC4-Kationenkanal zu einem möglichen Angriffspunkt in der zukünftigen Behandlung von Bluthochdruck (Inoue und Mori 2003) oder bestimmten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (Holzer 2011). Um über den TRPC4-Kanal in den Ca^{2+} -Haushalt einer Zelle gezielt eingreifen zu können, ist es jedoch zunächst erforderlich interagierende Proteine zu identifizieren und Signalwege, an denen der TRPC4-Kationenkanal beteiligt ist, genauer zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher der TRPC4-Kationenkanal und daran assoziierte Proteine mithilfe von Immunpräzipitationen angereichert und anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden. Zunächst sollten hierzu aus den in der Arbeitsgruppe vorliegenden TRPC4-spezifischen Antikörpern die für diese Zwecke geeigneten ausgewählt werden. Im nächsten Schritt sollten die Bedingungen der Immunpräzipitation optimiert werden. Dazu sollten Anreicherungen aus unterschiedlichen TRPC4-enthaltenden Geweben unter Verwendung verschiedener Antikörper und Detergenzien durchgeführt werden. Durch Vergleich der Ergebnisse mittels Western Blotting und Massenspektrometrie sollte das Protokoll ausgewählt werden, mit dem das TRPC4-Protein und interagierende Proteine am besten angereichert werden können. Die parallele Anfertigung von Anreicherungen mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern und deren massenspektrometrische Analyse, sollte dazu dienen diejenigen Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit TRPC4 in Wechselwirkung treten und daher mögliche Interaktionspartner dieses Kanalproteins darstellen. In weiteren Experimenten sollte anschließend die Interaktion der so identifizierten Proteine mit TRPC4 überprüft werden und gegebenenfalls die funktionelle Bedeutung der gefundenen Interaktion näher charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Alkylierungspuffer

50 mM	Ammoniumhydrogencarbonat
5 mM	Iodacetamid

Blotting-Puffer

20 % (v/v)	Methanol in 1 x SDS Elektrophoresepuffer
------------	--

Blue Silver Färbelösung

20 % (v/v)	Methanol
10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
10 % (v/v)	Phosphorsäure
0,12 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau G-250

Coomassie-Färbelösung

45 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure
0,125 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250

Destain-Lösung

9 % (v/v)	Ethanol
6 % (v/v)	Essigsäure

10 x DNS-Auftragepuffer

40 % (w/v)	Harnstoff
40 % (w/v)	Glycerin, wasserfrei
50 mM	EDTA pH 8,0
10 mM	Tris pH 7,0
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF

Entwicklerlösung

3 % (w/v)	Natriumcarbonat
0,05 % (v/v)	Formalin

Extraktionslösung

50 % (v/v)	Acetonitril
2,5 % (v/v)	Ameisensäure

Fixierlösung

40 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure

FURA-Puffer

115 mM	Natriumchlorid
2 mM	Magnesiumchlorid
5 mM	Kaliumchlorid
10 mM	HEPES pH 7,4

2 x Laemmli-Puffer

20 % (w/v)	Glycerin
10 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
8 % (w/v)	SDS
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
120 mM	Tris HCl pH 6,8

Magermilchlösung

5% (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-Puffer

LB (Lysogeny Broth)-Medium

1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein

1 % (w/v) Natriumchlorid

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

LB-Agar pH 7,5

1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium

LB-Ampicillin-Agar

50µg/ml Ampicillin in LB-Agar

Lösung A

50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Lösung B

25 mM Ammoniumhydrogencarbonat

50 % (v/v) Acetonitril

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym

10 x PBS-Puffer pH 7,4

137 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

2 mM Kaliumhydrogenphosphat

10 mM Dinatriumhydrogenphosphat

Ponceau-S-Lösung

2 % (w/v) Ponceau

3 % (v/v) Trichloressigsäure

Proteaseinhibitoren-Stammlösungen

1 M	Antipain in 50 % Ethanol
300 µM	Aprotinin in H ₂ O _{VE}
1 M	Benzamidin in H ₂ O _{VE}
300 mM	Iodacetamid in H ₂ O _{VE}
2 M	Leupeptin in 50 % Ethanol
2 M	Pepstatin in 100 % Ethanol
1 M	Phenanthrolin in 100 % Ethanol
100 mM	PMSF in 100 % Ethanol

Puffer B

0,26 % (w/v)	Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)
1,44 % (w/v)	Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)

Puffer C

3 M	Ammoniumsulfat in Puffer B
-----	----------------------------

Puffer D

0,5 % (w/v)	BSA in 1 x PBS-Puffer
-------------	-----------------------

Puffer E

0,1 % (w/v)	BSA in 1 x PBS-Puffer
-------------	-----------------------

Reduktionslösung

50 mM	Ammoniumhydrogencarbonat
10 mM	Dithiothreitol

RIPA-Puffer

150 mM	Natriumchlorid
50 mM	Tris HCl pH 8
5 mM	EDTA
1 % (w/v)	Nonidet P40
0,5 % (w/v)	Natriumdeoxycholat
0,1 % (w/v)	SDS

4 x Sammelgel-Puffer, pH 6,8

500 mM	Tris HCl
0,4 % (w/v)	SDS

SBP-Puffer, pH 7,4

250 mM	Natrimchlorid
50 mM	Tris
1 mM	Kalziumchlorid
0,5 % (v/v)	Nonidet P40

30 µg/ml RNaseA vor Gebrauch frisch dazugeben.

10 x SDS Elektrophoresepuffer

250 mM	Tris HCl pH 8,3
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

5 x Solubilisierungspuffer

500 mM	HEPES pH 7,5
750 mM	Natriumchlorid
5 mM	Calciumchlorid

STET-Puffer pH 8,0

8 % (w/v)	Saccharose
5 % (w/v)	Triton X-100
50 mM	Tris
50 mM	EDTA

STET-L-Puffer pH 8,0

8 % (w/v)	Saccharose
5 % (w/v)	Triton X-100
50 mM	Tris
50 mM	EDTA

vor Gebrauch Zugabe von Lysozym (100 µg/ml)

Stripping-Puffer

100 mM	β-Mercaptoethanol
62,5 mM	Tris HCl pH 6,8
2 % (w/v)	SDS

10 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer pH 8,0

89 mM	Tris
89 mM	Borat
1 mM	EDTA

10 x TBS-Puffer pH 7,5

500 mM	Tris
1,5 M	NaCl

4 x Trenngel-Puffer pH 8,8

1,5 M	Tris HCl
0,4 %	SDS

Trypsin-EDTA-Lösung

10 ml	10 x Trypsin/EDTA (# T4174, Sigma, München)
90 ml	1 x PBS-Puffer

Trypsinlösung

50 mM	Ammoniumhydrogencarbonat
10 ng/μl	Trypsin (Promega)

TSS-Puffer

10 %	PEG 3350
5 % (v/v)	DMSO
50 mM	Magnesiumchlorid
1 % (w/v)	Trypton/Pepton aus Casein
1 % (w/v)	Natriumchlorid
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

Waschpuffer für GST-Fusionsproteine

50 mM	Tris HCl pH 7,5
150 mM	Natriumchlorid

3.1.2 Organismen3.1.2.1 Zelllinien**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Bezugsquelle	Kulturmedium
HEK 293	Humane embryonale Fibroblasten aus Niere	(Graham et al. 1977)	ATCC* CRL-1573	90 % MEM 10 % FKS
SBAC	Zellen der Nebennierenrinde von Rind	(Gospodarowicz et al. 1977)	ATCC* CRL-1796	90 % Ham's F-12 10 % FKS FGF 0,5 ng/ml
COS-7	SV40 transformierte Affennierenzellen	(Gluzman 1981)	ATCC* CRL-1651	90 % MEM 10 % FKS

* American Type Culture Collection

3.1.2.2 Bakterienstämme

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E.coli*)-Deletionsstämme leiten sich von dem Stamm *E.coli* K12 ab.

3.1.2.2.1 *E.coli* XLI-Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]
(Stratagene, LA Jolle, USA)

3.1.2.2.2 *E.coli* BL21 (DE3)

B F- dcm ompT hsdS (r_B- m_B-) galλ (Stratagene, LA Jolle, USA)

3.1.3 Antikörper

3.1.3.1 Erstantikörper

Die jeweiligen Erstantikörper wurden in 1 x TBS-Puffer, dem 1% (w/v) BSA und 0,05 % (w/v) Natriumazid zugesetzt waren, angesetzt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Erstantikörper

Bezeichnung	Wirtstier	Epitop	Verdünnung	Hersteller
Anti-TRPC4–Antikörper				
bCCE1	Kaninchen	bTRPC4 AS 844-979 polyklonal	5 µg/ml	eigene Herstellung
236b	Kaninchen	bTRPC4 AS 966-979 polyklonal	5 µg/ml	eigene Herstellung
548	Kaninchen	mTRPC4 AS 943-958 polyklonal	5 µg/ml	eigene Herstellung
706	Kaninchen	mTRPC4 AS 822-834 polyklonal	5 µg/ml	eigene Herstellung
781	Kaninchen	mTRPC4 AS 953-974 polyklonal	5 µg/ml	eigene Herstellung
984	Kaninchen	mTRPC4 AS 788-807 polyklonal	5 µg/ml	eigene Herstellung

1091	Kaninchen	mTRPC4 β AS 771-790 polyklonal	5 μ g/ml	eigene Herstellung
1092	Kaninchen	mTRPC4 β AS 771-790 polyklonal	5 μ g/ml	eigene Herstellung
1142	Ratte	mTRPC4 AS 933-952 monoklonal	5 μ g/ml	eigene Herstellung
1143	Ratte	mTRPC4 AS 959-969 monoklonal	5 μ g/ml	eigene Herstellung
Sun113	Kaninchen	mTRPC4 AS 953-974 monoklonal	5 μ g/ml	eigene Herstellung
Anti-FRYL-Antikörper				
A302-644A	Kaninchen	hFRYL AS 2963-3013 polyklonal	1:1000 (0,5 μ g/ml)	Bethyl Laboratories
95065	Kaninchen	hFRYL AS 2600-2650 polyklonal	1:2000 (0,1 μ g/ml)	Abcam
Anti-GST-Antikörper				
27457701	Ziege	schistosomales GST polyklonal	1:2000	GE Healthcare Life Science
Anti-PPFIBP1-Antikörper				
13961-1-AP	Kaninchen	hPPFIBP1 AS 662-1011 polyklonal	1:800 (0,2 μ g/ml)	Proteintech
NBP1-83192	Kaninchen	hPPFIBP1 AS 367-424 polyklonal	1:250 (1,2 μ g/ml)	Novus Biologicals
Weitere Antikörper				
KANK2	Kaninchen	hKANK2 AS 550-600	1:2000 (5 μ g/ml)	Bethyl Laboratories
ANKRD17	Kaninchen	hANKRD17 AS 775-825	1:2000 (5 μ g/ml)	Bethyl Laboratories

3.1.3.2 Zweitantikörper

Die Zweitantikörper sind zur Detektion mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert und wurden in 5% Magermilchlösung angesetzt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Zweitantikörper

Bezeichnung	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	Esel	1:50.000	GE Healthcare, München
Anti-Ratte-IgG	Kaninchen	1:80.000	Sigma, Saint Louis
Anti-Ziege-IgG	Esel	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology

3.1.4 Proteinmarker

Tabelle 4: Liste verwendeter Proteinmarker

Bezeichnung	Markerbanden (kDa)	Hersteller
Precision Plus Protein Standards Dual Color	250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10	Bio-Rad
HighMark Pre-stained High Molecular Weight Protein Standard	420; 247; 214; 160; 107; 64; 51; 39; 28 (NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 4-12%)	Invitrogen

3.1.5 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomal gelegene, zirkuläre Doppelstrang-DNS-Moleküle, die in Bakterien unabhängig vom Genom repliziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Plasmide verwendet. Als Selektionsgen enthalten sie ein Ampicillin-Resistenzgen.

3.1.5.1 pBluescript II SK-

Der pBluescript II SK- (Thermo Scientific) ist ein 2961 bp großer Klonierungsvektor. Über eine Blau-Weiß-Selektion können bei der Klonierung diejenigen Klone selektiert werden, in denen das gewünschte DNS-Fragment in den Vektor inseriert wurde.

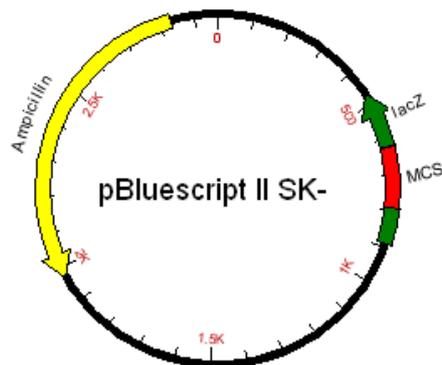


Abbildung 4: Schematische Darstellung des pBluescript II SK-.

Der pBluescript II SK- trägt zur Selektion transformierter Klone ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Multiple Cloning Site (MCS) liegt inmitten des lacZ-Gens, sodass eine Blau-Weiß-Selektion möglich ist.

3.1.5.2 pCAGGS-IRES-GFP

Der Vektor pCAGGS-IRES-GFP als Ausgangsvektor für weitere Klonierungsschritte wurde von PD Ulrich Wissenbach zur Verfügung gestellt. Die im Plasmid enthaltene IRES (internal ribosomal entry site) Sequenz ermöglicht es, zwei cDNS-Sequenzen unabhängig voneinander zu exprimieren, die des GFP-Proteins und die klonierte cDNS. Das GFP-Protein kann anschließend durch Anregung bei einer Wellenlänge von 480 nm und Einstellung eines entsprechenden Filters unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. So ist es möglich Zellen zu selektieren, die erfolgreich transfiziert wurden.

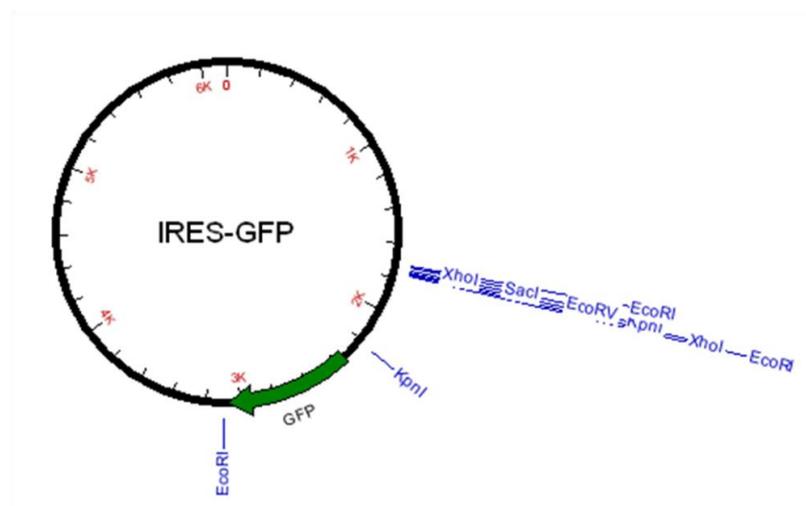


Abbildung 5: Vektorkarte des pCAGGS-IRES-GFP.

Schematische Darstellung des ca. 6100 bp großen pCAGGS-IRES-GFP. Die IRES-Sequenz ermöglicht es zwei cDNS-Sequenzen unabhängig voneinander zu exprimieren. Durch den Nachweis des GFP-Proteins unter dem Fluoreszenzmikroskop können Zellen selektiert werden, die erfolgreich transfiziert wurden.

3.1.5.3 pGEX-4T-2

Der pGEX-4T-2 (GE Healthcare, München) ist ein Expressionsvektor, der es ermöglicht Fusionsproteine herzustellen, denen N-terminal die Glutathion-S-Transferase angefügt ist. Die Expression kann durch die Zugabe von IPTG, welches den lac-Operator aktiviert, induziert werden. In meiner Arbeit wurde dieser Vektor verwendet, um verschiedene TRPC4-GST-Fusionsproteine zu generieren.

3.1.6 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und modifizierenden Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs hergestellt.

3.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Sie alle wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon bestellt. Die Oligonukleotide wurden mit H₂O_{steril} auf eine Konzentration von 100 pM verdünnt und bei -20 °C gelagert. Für die jeweiligen Anwendungen verwendete ich 10 pM Gebrauchslösungen.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'→3'	T _M (°C)	Verwendung
pCAGGS for	5'-AAC GTG CTG GTT GTT GTG C-3'	58	Sequenzierung pCAGGS
pCAGGS rev	5'-CAT ATA GAC AAA CGC ACA CC-3'	58	Sequenzierung pCAGGS
FV79	5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA CG-3'	60	Sequenzierung pBlueScript SK-
FV80	5'-CAC AGG AAA CAG CTA TGA CC-3'	60	Sequenzierung pBlueScript SK-
CFT1	5'-ACG GTC CAG TCT GCC CAG-3'		Herstellung von C4FM5
CFT2	5'-TCA TTG TTT CGA TCG TCT GTG AAA C-3'		Herstellung von C4FM5
mFRYL_03	5'-[Phos]-CCG CCG CCA CCA TGT CAA GCA TCA CGA TTG AC-3'	60	Amplifikation mFryl mit Kosak

mFRYL_04	5'-[Phos]-TCA GAA TCC AGT GCT CGT CA-3'	60	Amplifikation mFryl
mPPFIBP1_03	5'-[Phos]-CCG CCG CCA CCA TGA TGA GTG ACG CTA GTG AC-3'	62	Amplifikation von mPPFIBP1 mit Kosak
mPPFIBP1_04	5'-[Phos]-TCA AAC GTT GGA GTC TTC ATC-3'	60	Amplifikation mPPFIBP1
FM_05	5'-[Phos]-CCA CTA GTG CCG CCA CCA TGT CAA GCA TCA CGA TTG AC-3'	60	Amplifikation von mFryl in 3 Fragmenten mit Kosak und SpeI- Schnittstelle
FM_06	5'-[Phos]-GGG TTG GTC CTG CCG AGG C-3'	66	Amplifikation mFryl in 3 Fragmenten
FM_07	5'-[Phos]-GGG AGT CTT TAG AGA ATT AAT AGA G-3'	68	Amplifikation mFryl in 3 Fragmenten
FM_08	5'-[Phos]-CAT ACT TGT TTC CCA TGA CAG G- 3'	64	Amplifikation mFryl in 3 Fragmenten
FM_09	5'-[Phos]-CGG CTG GTG GAG ACT GTA GG-3'	66	Amplifikation mFryl in 3 Fragmenten
FM_10	5'-[Phos]-ACT AGT TCA GAA TCC AGT GCT CGT C-3'	62	Amplifikation mFryl in 3 Fragmenten mit SpeI-Schnittstelle
FM_11	5'-TGG ACG GTG AAA GAC TTC AG-3'	60	Sequenzierung mPPFIBP1
FM_12	5'-TCA AGT CTG CAG AAA TCT AGC-3'	60	Sequenzierung mPPFIBP1
FM_13	5'-GCA TCA AGC ATT CAC TGC ATC-3'	60	Sequenzierung mPPFIBP1
FM_14	5'-TCG TGA CTG AGC TGA AAG AG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 1
FM_15	5'-GAA GAT CAT CCA GTT CAT TGC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 1
FM_16	5'-TCA CAA TCC ACA TGG ATG AAG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 1
FM_17	5'-GCA GAT AAT GTG GGA CTG TC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 2
FM_18	5'-GAA GAT GAA GAT GAC TCC TTG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 2
FM_19	5'-ATG GCA ACC CTG ACA GTA AG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 2
FM_20	5'-CAC TTG CCT CTG GAT AAG TC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 3

FM_21	5'-TCA ACA TCC TGA AGC TGG TG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 3
FM_22	5'-AGC ATG GAC AAT TTC AAC TGG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 3
FM_23	5'-AAG ATG AAC AAG ACG GCT TTC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment 3
FM_24	5'-CTA CCT CCT CTA GTA TCA GC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment2+3
FM_25	5'-AGC TCT GTA GAT CTG CAG AC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment1+2+3
FM_26	5'-AGC ATG GAG ATC ACA GAG TC-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment1+2+3
FM_27	5'-AGA GGA TGC ACA GGG ATT TG-3'	60	Sequenzierung mFryl Fragment1+2+3

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten an eukaryotischen Zellen wurden an einer Sicherheitswerkbank (Holten Lamin Air, Modell S 2010) durchgeführt. Die eingesetzten Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert, verwendete Einmalartikel (serologische Pipetten, Kulturflaschen) wurden steril von den jeweiligen Firmen bezogen. Die eukaryotischen Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um einen Gasaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten, wurden die Verschlusskappen der Kulturflaschen leicht geöffnet.

3.2.1.1 Passagieren eukaryotischer Zellen

Waren eukaryotische, adhären wachsende Zellen bis zur Konfluenz herangewachsen, mussten diese, um ihre weitere Vitalität zu gewährleisten, verdünnt und neu ausgesät werden. Das Kulturmedium wurde hierzu abgesaugt, die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Durch 3 Min. Inkubation und leichtes Beklopfen der Kulturflasche lösten sich die Zellen vom Boden ab. Das Trypsin wurde durch

Zugabe des doppelten Volumens an Kulturmedium inaktiviert. Durch 5 Min. Zentrifugation bei 1.000 x g wurden die Zellen sedimentiert, anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die trypsinisierten Zellen wurden hierzu in die Zählkammer eingebracht und anschließend vier Quadranten ausgezählt. Jeder Quadrant besitzt eine Fläche von 1 mm² und eine Tiefe von 0,1 mm, sodass die erhaltene Zellzahl multipliziert mit dem Faktor 10⁴ die Zellzahl pro Milliliter wiedergibt.

3.2.1.3 Ernten eukaryotischer Zellen

Zum Ernten wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung überdeckt. 3 Min. Inkubation und leichtes Beklopfen der Kulturflasche führten dazu, dass sich die Zellen vom Boden ablösten. Das Trypsin wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an Kulturmedium auf die Zellen inaktiviert. Durch 5 Min. Zentrifugation bei 1.000 x g wurden die Zellen sedimentiert, das erhaltene Zellpräzipitat wurde einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.1.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNS in eukaryotische Zellsysteme. In meiner Arbeit wurde hierzu die erstmals 1987 von Felgner et al. beschriebene Lipofektion (Felgner et al. 1987) mit Fugene 6 (Roche, Mannheim) verwendet. Bei diesem Verfahren werden kationische Lipide mit anionischen DNS-Molekülen zusammengebracht. Es bilden sich dabei Liposomen-DNS-Komplex aus, die mit der Zellmembran eukaryotischer Zellen fusionieren. Die DNS wird so im Zellinneren freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo sie exprimiert werden kann.

24 Std. vor Transfektion wurden die entsprechenden Zellen in Kulturschälchen (3,1 cm Durchmesser) ausgesät und wuchsen dort bis zur Transfektion auf eine Konfluenz von etwa 60-70 % heran. Zellen, die nach der Transfektion für FURA-Experimente (3.2.6) verwendet werden sollten, wurden in Kulturschälchen gegeben, in denen ein zuvor mit POLY-L-Lysin beschichtetes Glasplättchen gelegt worden war.

Für die Transfektion wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 100 µl Optimem 1-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 6 µl Fugene 6 vermischt und bei RT für 5 Min. inkubiert. Dem Ansatz wurden 2 µg Plasmid-DNS zugesetzt, dieser erneut gut gemischt und für 15 Min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die am Vortrag in Kulturschälchen ausgesäten Zellen mit 2 ml frischem Kulturmedium bedeckt und der Transfektionsansatz nach ausreichender Inkubationszeit auf die Zellen pipettiert. Diese wurden nun für weitere 24-48 Std. kultiviert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung eines RIPA-Lysates aus HEK293- bzw. SBAC-Zellen

Zum Nachweis eines bestimmten Proteins mithilfe spezifischer Antikörper mussten zunächst Proteinextrakte aus Zellen oder Geweben hergestellt werden, die das jeweilige Protein exprimieren. Hierbei wurden die Zellen zunächst aufgeschlossen, Proteine in Lösung gebracht und von unlöslicher Zelldebris getrennt. Das durch Ernten einer großen Kulturflasche (175 cm²) erhaltene Zellpellet wurden dazu in 1,5 ml RIPA-Puffer aufgenommen, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren lysiert und für 30 Min. bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Membranproteine wurden dabei durch die verschiedenen im Puffer enthaltenen Detergenzien (Natriumdeoxycholat, Nonidet P40, SDS) solubilisiert. Durch Zentrifugation für 15 Min. bei 14.000 x g wurden unlösliche Zellbestandteile sedimentiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt (3.2.2.3). Alle beschriebenen Schritte erfolgten bei -4°C oder auf Eis.

3.2.2.2 Mikrosomenpräparation aus Hirngewebe von Ratte

Die mikrosomale Proteinfraction eines Gewebes setzt sich hauptsächlich aus Membranbestandteilen des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien und der Zellmembran zusammen. Um diese Proteinfraction aus Hirngewebe von Ratte zu gewinnen, wurde das Verfahren der differentiellen Zentrifugation angewandt. Hierbei nutzt man die verschiedenen Sedimentationsgeschwindigkeiten von Zellbestandteilen unterschiedlicher Größe und Dichte, um diese voneinander zu trennen.

Zunächst wurden etwa 20 g präpariertes Hirngewebe in 40 ml 1 x TBS-Puffer aufgenommen und in Gegenwart von Proteaseinhibitoren mithilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Es

erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt für 20 Min. bei 4 °C und 10.000 x g, mit dem große Zellbestandteile wie Zellkerne sedimentiert wurden. Der hierbei gewonnene Überstand wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment hingegen wurde erneut in 40 ml 1 x TBS-Puffer (inklusive Proteaseinhibitoren) resuspendiert, mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert (20-mal) und in einem zweiten Zentrifugationsschritt für 20 Min. bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und diese nun einem dritten Zentrifugationsschritt für 45 Min bei 4 °C und 100.000 x g unterzogen. Hierbei wurden zytosolische von mikrosomalen Proteinfractionen separiert. Das Sediment, das nun die mikrosomale Proteinfraction enthielt, wurde abschließend in 10 ml 1 x TBS-Puffer (inklusive Proteaseinhibitoren) resuspendiert, erneut mittels Glas-Teflon-Potter homogenisiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden mittels BCA-Assay (3.2.2.3) die Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.2.3 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Der Bicinchoninsäure-Assay ist ein sensitives, kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Proteinbestimmung (Smith et al. 1985). Zugrunde liegt dieser Methoden die sogenannte Biuret-Reaktion, die beschreibt, dass zweiwertige Kupferionen in Gegenwart von Peptidbindungen zu einwertigen reduziert werden. Diese bilden im alkalischen Milieu zusammen mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm Licht proportional zur Proteinkonzentration absorbiert.

Die Proteinbestimmungen wurden mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Von den Proben, deren Proteinkonzentration bestimmt werden sollte, wurden jeweils doppelte Ansätze verschiedener Verdünnungen hergestellt (1:100, 1:200, 1:400). Jeweils 50 µl der Verdünnungen wurden mit 300µl der frisch angesetzten BCA-Lösung (50:1, Reagenz A:B) versetzt und anschließend 30 min bei 60 °C inkubiert. 300 µl dieser Ansätze wurden daraufhin in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 562 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

Um eine Eichgerade zu erstellen, wurde zusätzlich zur Absorption der Proben auch die Absorption einer Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) gemessen (0,00; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 µg/µl). Durch den Abgleich der Absorptionswerte der Proteinproben mit der BSA-Eichgerade konnte so die Proteinkonzentration ermittelt werden.

3.2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein elektro-phoretisches Verfahren zur Auftrennung komplexer Proteingemische anhand ihres molekularen Gewichtes. SDS (sodium dodecyl sulfate) ist ein anionisches Detergens, das in einem festen Verhältnis (1,4g SDS pro g Protein) an Proteine bindet. Diese werden dabei denaturiert und es entstehen negative SDS-Protein-Komplexe mit einem festen Ladungs-zu-Masseverhältnis. Trägt man die so mit SDS behandelten Proteinproben nun auf ein Polyacrylamidgel auf und legt ein elektrisches Feld an, bewegen sich die Proteine zur Anode hin und werden anhand ihres molekularen Gewichtes aufgetrennt. In meiner Arbeit wurden zwei verschiedene Gel-Puffersysteme verwendet, zum einen Polyacrylamidgele mit einem Glycin-Tris-Puffersystem, zum anderen fertige Gradientengele der Firma Invitrogen (NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels), welche ein Bis-Tris-Puffersystem verwenden.

3.2.2.4.1 Auftrennung von Proteingemischen mittels Tris-Glycin-Puffersystem

Die diskontinuierliche Elektrophorese mittels Tris-Glycin-Puffersystem wurde 1970 von Laemmli beschrieben (Laemmli 1970). Die Polyacrylamidgele bestehen hierbei aus einem ca. 1 cm hohen, großporigen Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer, pH 6,8) und einem Trenngel (Tris-Glycin-Puffer, pH 8,8). Die aufzutrennenden Proteinproben werden zunächst mit dem gleichen Volumen an 2 x Laemmli-Puffer versetzt und anschließend 20 Min. bei 61 °C denaturiert. Vorhandene Disulfidbindungen werden dabei durch das im Laemmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert. Bevor die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgeles eingebracht werden, wird dieses zunächst in eine Elektrophoresekammer (Biorad) eingespannt und mit 1 x SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Anschließend wird eine Spannung von 80 V angelegt, sodass die Proteine langsam in das Sammelgel einlaufen. Nach 20 Min. wird diese auf 150 V erhöht, die Proteine werden so nach ihrem Molekulargewicht im Trenngel separiert.

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine wurden für das Trenngel unterschiedliche Konzentrationen an Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) verwendet. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der verwendeten Gele.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele

	Sammelgel	Trenngel		
	4%	7%	8%	12%
40 % (w/v) Acrylamid	0,5 ml	1,75 ml	2,0 ml	3,0 ml
H ₂ O _{VE}	3,21 ml	5,66 ml	5,41 ml	4,41 ml
4 x Sammel-/Trenngel-Puffer	1,25 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
APS	37,5 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Gesamt	5 ml	10 ml	10 ml	10 ml

3.2.2.4.2 Auftrennung von Proteingemischen mittels Bis-Tris-Puffersystem

Für diese Arbeit wurden außerdem die NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels (4-12%) der Firma Invitrogen verwendet. Diese Gradientengele sind nicht wie bei dem oben beschriebenen Laemmli-System aus Trenn- und Sammelgel zusammengesetzt, sondern weisen eine kontinuierlich von 4% bis auf 12 % ansteigende Acrylamidkonzentration auf. Dadurch können Proteingemische über einen größeren Massenbereich gleichzeitig in einem Gel aufgetrennt werden. Die Proben wurden vor dem Gellauf mit dem entsprechenden Volumen an 4 x LDS-Puffer (Invitrogen) und DTT (50 mM) versetzt und anschließend 20 Min. bei 61 °C denaturiert. Das zur Auftrennung eingesetzte Gel wurde zunächst in die XCell SureLock Elektrophoresekammer (Invitrogen) eingespannt und mit MOPS-Puffer (Invitrogen), dem 500 µl Antioxidantlösung (Invitrogen) zugegeben worden waren, überschichtet. Die Proben wurden nun in die Taschen des Gels pipettiert und eine Spannung von 80 V angelegt. Nach 20 Min. wurde diese für die restliche Laufzeit auf 200 V erhöht.

3.2.2.5 Western Blot und Proteindetektion mittels Chemilumineszenz

Die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können durch die Technik des Western Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und dort mithilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden.

In meiner Arbeit wurde das Tankblotting-Verfahren, wie es 1979 von Towbin vorgestellt wurde, verwendet (Towbin et al. 1979). Das Polyacrylamidgel wird hierbei luftblasenfrei auf eine mit Blotting-Puffer befeuchtete Nitrocellulosemembran (Hybond-C extra, GE Healthcare, München) gelegt, eingebettet in Filterpapier beides in eine Kunststoffkassette

eingeklemmt und das gesamte „blotting sandwich“ in eine mit Blotting-Puffer gefüllte Kammer der Firma Biorad eingebracht. Durch ein elektrisches Feld, das senkrecht zum Polyacrylamidgel und zur Nitrocellulosemembran angelegt wird, werden die Proteine aus dem Gel herausbewegt und auf die Nitrocellulosemembran übertragen, an der sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen haften. Das im Blotting-Puffer enthaltene Methanol verstärkt dabei die Wechselwirkung zwischen Protein und Membran. Der Proteintransfer erfolgt für 1,5 Stunden bei 350 mA und 4 °C.

Auf der Nitrocellulosemembran wurden die Proteine durch die Färbung mit Ponceau-S-Lösung sichtbar gemacht und der Proteinstandard mit Kugelschreiber gekennzeichnet. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden anschließend durch einstündige Inkubation mit 5 %-iger Magermilchlösung abgesättigt.

Zur Detektion eines bestimmten Proteins auf der Nitrocellulosemembran wurde diese bei 4 °C über Nacht mit dem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Antikörper, dem sog. Primär- oder Erstantikörper, inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen mit 1 x TBS-Puffer für 10 Min. entfernt. Anschließend wurde ein in Magermilchpulver angesetzter, Peroxidase-konjugierter Zweitantikörper (Sekundärantikörper) dazugegeben, der gegen das F_c-Fragment des Erstantikörpers gerichtet ist und daher an diesen bindet. Nachdem Membran und Zweitantikörper eine Stunde lang inkubiert und erneut dreimal für 10 Min. mit 1 x TBS-Puffer gewaschen worden waren, wurde das nach Angaben des Herstellers frisch angesetzte ECL-Reagenz (Western Lightning Chemilumineszenz Plus, Perkin Elmer, Boston, USA) dazugegeben. Das darin enthaltene Luminol wird von der Meerrettich-Peroxidase umgesetzt und die dabei entstehende Chemilumineszenz durch das Dokumentationssystem Lumineszenz Image Analyzer LAS3000 (Fuji) über einen Zeitraum von einer Stunde detektiert.

3.2.2.6 Ablösen der Antikörper von Western Blots

Zum Entfernen von Antikörpern von der Nitrocellulosemembran wurde diese 3 x 5 Min. mit TBST gewaschen, anschließend für 30 min bei 50 °C mit Stripping-Puffer inkubiert. SDS und β -Mercaptoethanol, die im Stripping-Puffer enthalten sind, lösen dabei die gebundenen Erstantikörper von der Membran ab. Die Membran wurde nun erneut 6 x 5 Min. mit TBST gewaschen und anschließend nicht besetzte Proteinbindungsstellen mit 5 %-iger Magermilchlösung für 1 Std. bei RT blockiert.

3.2.2.7 Färben von Proteinen im Polyacrylamidgel

Nach der Auftrennung von Proteingemischen durch die SDS-PAGE können die Proteine im Gel durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Die Methoden unterscheiden sich zum einen durch ihre Empfindlichkeit, zum anderen aber auch durch ihre Kompatibilität mit massenspektrometrischen Messungen. In meiner Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Färbungen verwendet.

3.2.2.7.1 *Coomassie-Färbung*

Die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R 250 (Chrambach et al. 1967) ist mit einer unteren Nachweisgrenze von 200 ng pro Bande eine vergleichsweise insensitive Färbemethode. Nach der SDS-PAGE wird das Polyacrylamidgel eine Stunde lang in Coomassie-Färbelösung gegeben. Der Farbstoff interagiert dabei mit kationischen und unpolaren Seitenketten von im Gel enthaltenen Proteinen. Zum Entfärben wird das Gel so lange mit Destain-Lösung gewaschen, bis die gewünschten Proteinbanden darin sichtbar werden.

3.2.2.7.2 *Blue Silver Färbung*

Die von Candiano et al. entwickelte hoch sensitive Blue Silver Färbung (Candiano et al. 2004) lehnt sich an die 1988 von Neuhoff beschriebene kolloidale Coomassie-Färbung (Neuhoff et al. 1988) an. Mit einer unteren Nachweisgrenze von 1 ng pro Bande weist sie eine Sensitivität auf, die der einer Silberfärbung gleichkommt – daher die Bezeichnung „Blue Silver Färbung“. Zudem kann diese Färbemethode mit massenspektrometrischen Verfahren kombiniert werden. Vor dem eigentlichen Färbeschritt müssen die Proteine zunächst im Gel fixiert werden. Dies erfolgt durch einstündige Inkubation des Polyacrylamidgels in Fixierlösung (40% Ethanol/10% Essigsäure). Anschließend wird das Gel 3 x 15min mit H_2O_{VE} gewaschen, bevor es über Nacht in die Coomassie-Färbelösung gelegt wird. Zum Entfärben wird das Gel solange in H_2O_{VE} gewaschen, bis die blau angefärbten Proteinbanden sichtbar werden.

3.2.2.7.3 *Silberfärbung*

Bei der Silberfärbung bilden Silberionen Komplexe mit den Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure und Cystein der im Polyacrylamidgel befindlichen Proteine. Durch Reduktion der Ionen durch alkalisches Formaldehyd wird das metallische Silber und somit auch die

daran assoziierten Proteine im Gel sichtbar. Heukeshoven und Dernick verbesserten die 1981 (Merril et al. 1981) beschriebene herkömmliche Silberfärbung durch einen zusätzlichen Reduktionsschritt mit Thiosulfat und senkten damit ihre Empfindlichkeit auf einen Bereich von 50-100 ng Protein pro Bande (Heukeshoven und Dernick 1988). Damit gilt dieses Verfahren bis heute als das sensitivste zum Anfärben von Proteinen im Polyacrylamidgel.

Konkret wurden folgende Schritte durchgeführt: Zunächst wurden die mittels SDS-PAGE (3.2.2.4) aufgetrennten Proteine durch einstündige Inkubation in Fixierlösung (40 % Ethanol/ 10 % Essigsäure) im Gel fixiert. Die Lösung wurde durch zweimaliges Waschen mit 30 % Ethanol und einen weiteren Waschschrift mit H_2O_{VE} entfernt und anschließend die Reduktion durch 1 Min. Inkubation in 0,02 % Natriumthiosulfat-Lösung durchgeführt. Nachdem auch diese Lösung durch dreimaliges Waschen für 30 Sek. mit H_2O_{VE} entfernt worden war, wurde das Gel für 20 Min. in 0,1 % Silbernitratlösung gelegt, danach erneut 3-mal mit H_2O_{VE} gespült und schließlich zum Entwickeln mit Entwicklerlösung überschichtet. Bei ausreichender Färbung der Proteinbanden wurde die Entwicklerlösung abgenommen, das Gel einmal mit H_2O_{VE} gewaschen und durch Zugabe von 0,05 M EDTA-Lösung die Entwicklungsreaktion gestoppt.

3.2.2.8 Immunpräzipitation

Durch die Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Protein (Antigen) mithilfe eines für dieses Protein spezifischen Antikörpers aus einem komplexen Proteingemisch aufgereinigt werden. Der Antikörper wird dabei zunächst an ein Säulenmaterial gekoppelt. Der Komplex aus Säule und Antikörper wird daraufhin mit einem Proteingemisch inkubiert, sodass das zu isolierende Protein an den Antikörper binden und anschließend durch die Eigenschaften des verwendeten Säulenmaterials aufgereinigt werden kann. Je nach Versuchsbedingungen wird durch dieses Verfahren nicht nur das Protein angereichert, das der verwendete Antikörper erkennt, sondern auch verschiedene andere Proteine, die mit dem Zielprotein interagieren. Diese sogenannte Ko-Immunpräzipitation kann daher verwendet werden, um putative Interaktionspartner des Zielproteins zu isolieren und diese anschließend durch Western Blotting (3.2.2.5) oder durch die Massenspektrometrie (3.2.3) zu identifizieren.

Handelt es sich bei dem zu isolierenden Antigen um ein integrales Membranprotein, muss dieses zunächst aus der Zellmembran solubilisiert, d.h. in Lösung gebracht werden. Zu diesem Zweck wird dem Solubilisierungspuffer eine Seife (Detergens) zugesetzt. Detergenzien sind amphiphile Verbindungen, besitzen also sowohl einen hydrophilen als auch einen

hydrophoben Anteil. Die hydrophoben Bereiche eines Membranproteins treten nun mit denen des Detergenz in Wechselwirkung, wodurch das Protein aus der Lipiddoppelschicht in Micellen des Detergens übergeht.

In den von mir aus unterschiedlichen Geweben und Zelllinien durchgeführten Immunpräzipitationen wurden verschiedene Detergenzien, Puffer und Säulenmaterialien verwendet. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die jeweiligen Versuchsbedingungen.

Tabelle 7: Versuchsbedingungen der durchgeführten Immunpräzipitationen

	Antikörper	Gewebe/Zellen	Detergens und Puffer	Säulenmaterial	Nachweis von TRPC4 mittels	
					WB	MS
IP1	bCCE1 236b	Rattenhirnmikrosomen	DDM 1 % in Solubilisierungspuffer	ProteinA Agarose	+	-
IP2	236	COS bTRPC4	Digitonin 1 % in Solubilisierungspuffer	Dynabeads tosylactivated	+	MS- TOF
IP3	Sun113	Hirngewebe von Maus	Desoxycholat 0,1 %, Nonidet P40 0,5 % in SBP-Puffer	Dynabeads tosylactivated	+	ESI- MS
IP4, 5	bCCE1	SBAC, HEK bTRPC4	Digitonin 1 % in Solubilisierungspuffer	Dynabeads tosylactivated	+	ESI- MS
IP6	bCCE1 A302-644A	mit mFryl transfizierte HEK mC4	Digitonin 1 % in Solubilisierungspuffer	ProteinA- Beads	+	-
IP7	bCCE1 13961-1-AP	mit mLiprin-beta-1 transfizierte HEK	Digitonin 1 % in Solubilisierungspuffer	ProteinA- Beads	+	-

3.2.2.8.1 Herstellung eines Gewebeextraktes aus Hirn von Maus

Frisch entnommenes und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Hirngewebe von 5 Mäusen wurde in einem Mixer (Waring Blender) zerkleinert. Die so hergestellten Gewebestücke wurden in 10 ml SBP-Puffer (inklusive Proteaseinhibitoren) aufgenommen, mithilfe eines Glas-Teflon-Potters homogenisiert und anschließend mit 0,1 % (w/v) Desoxycholat und 1 mM EDTA versetzt. Der Ansatz wurde für 1 Std. bei 4 °C auf einem Rollenschüttler inkubiert, daraufhin erneut mit einem Glas-Teflon-Potter behandelt und abschließend für 45 Min. bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert. Der gewonnene Überstand

konnte nun mit den an das entsprechende Chromatographiematerial gekoppelten Antikörpern inkubiert werden.

3.2.2.8.2 Herstellung eines Zellextraktes aus verschiedenen Zelllinien

Die geernteten Zellen (SBAC, mit bTRPC4 stabil transfizierte HEK293 oder mit bTRPC4 transient transfizierte COS-Zellen) wurden in einer angemessenen Menge an 1 x Solubilisierungspuffer, dem 1 % Digitonin und Proteaseinhibitoren zugesetzt waren, aufgenommen und mithilfe eines Glas-Teflon-Potters homogenisiert. Durch einstündige Inkubation bei 4 °C auf einem Rollenschüttler wurden die Proteine in Lösung gebracht und anschließend durch Zentrifugation für 45 Min. bei 4 °C und 100.000 x g von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Der so gewonnene Überstand wurde in der Immunpräzipitation eingesetzt.

3.2.2.8.3 Kovalente Bindung von Antikörpern an tosyl-aktivierte magnetische Beads

Antikörper, die zur Aufreinigung eines bestimmten Proteins in der Antikörper-Affinitätschromatographie verwendet werden sollten, wurden kovalent an paramagnetische Beads der Firma Invitrogen (Dynabeads[®] M-280 Tosylactivated) gekoppelt. Wie in Abbildung 6 dargestellt sind die Beads über eine Esterbindung mit der Tosylgruppe, dem Säurerest der p-Toluolsulfonsäure, verknüpft. Bringt man die elektrophile Tosylgruppe in

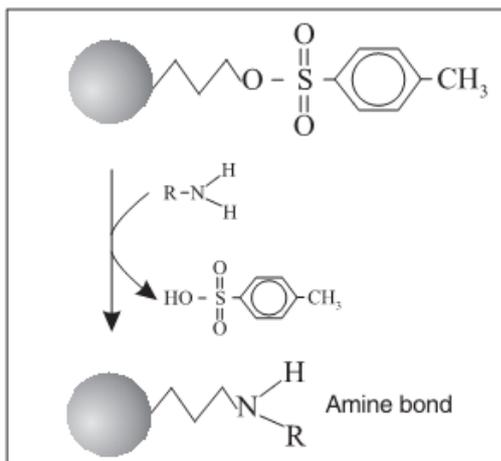


Abbildung 6: Kovalente Kopplung von Antikörpern an Dynabeads M-280 Tosylactivated.

Die Antikörper werden unter Abspaltung des Tosylrestes über eine Amidbindung kovalent an die paramagnetischen Beads gekoppelt (Herstellerangaben Invitrogen).

Kontakt mit einer nukleophilen Verbindung, wie z.B. der Aminogruppe von Proteinen, wird die Tosylgruppe aus ihrer Bindung verdrängt und stattdessen eine Amidbindung zu dem Protein gebildet. So können Antikörper über ihren N-Terminus oder über Lysin-Seitenketten kovalent an die magnetischen Beads gekoppelt werden.

Konkret wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden 165 µl Dynabead-Lösung, (entspricht 5 mg Beads) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in diesem auf einem magnetischen Ständer der Firma Invitrogen plaziert. Die Beads sammelten sich durch den Magneten angezogen am Rand des Reaktionsgefäßes, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Nach einmaligem Waschen mit 1 ml Puffer B wurden 100 µg Antikörper dazupipettiert, das Volumen mit Puffer B auf insgesamt 150 µl aufgefüllt und zuletzt 100 µl Puffer C dazugegeben. Der Ansatz wurde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich die kovalenten Bindungen zwischen Antikörpern und Beads ausbilden konnten. Nach 24 Std. wurde mithilfe des magnetischen Ständers der Überstand entfernt, die noch freien Bindungsstellen der Beads wurden durch einstündige Inkubation mit dem BSA-haltigen Puffer D abgesättigt. Abschließend wurde zweimal mit Puffer E gewaschen, die Beads in 1 ml Puffer E aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.2.8.4 Nicht-kovalente Bindung von Antikörpern an magnetische ProteinA-Beads

Sollten Antikörper, die nur in geringen Mengen (< 10 µg) vorlagen, in Immunpräzipitationen verwendet werden, wurden diese nicht-kovalent an paramagnetische ProteinA-Beads der Firma Invitrogen (Dynabeads[®] ProteinA) gekoppelt. Das kovalent an die Dynabeads gebundene ProteinA ist ein ursprünglich aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* isoliertes Protein, das mit hoher Affinität die Fc-Region von Immunglobulinen bindet.

Für eine Immunpräzipitation wurden 50 µl Dynabead-Lösung (entspricht 1,5 mg Beads) entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Überstand mithilfe eines magnetischen Ständers der Firma Invitrogen entfernt. Die Beads wurden einmal mit 1 ml 1 x Solubilisierungspuffer äquilibriert. Anschließend wurden den Beads 5 µg des jeweiligen Antikörpers in 200 µl 1 x Solubilisierungspuffer zugegeben und der Ansatz 1 Std. bei 4 °C auf einem Rollenschüttler inkubiert. Nachdem die Beads, die nun nicht-kovalent mit dem jeweiligen Antikörper verknüpft waren, mit 1 ml 1 x Solubilisierungspuffer gewaschen worden waren, wurden sie ohne weitere Lagerung direkt in der Immunpräzipitation eingesetzt.

3.2.2.8.5 Nicht-kovalente Bindung von Antikörpern an ProteinA Agarose

In IP 1 (siehe Tabelle 7) wurden Antikörper nicht-kovalent an ProteinA Agarose (Pierce[®] Protein A Agarose, Thermo Scientific) gekoppelt. Hierzu wurden 60 µl des Agarose-Ansatzes

(entspricht 30 µl ProteinA Agarose) entnommen und diese zweimal mit 1 x Solubilisierungspuffer, dem 0,1 % DDM und Proteaseinhibitoren zugesetzt worden waren, gewaschen. Anschließend wurden 5 µg des jeweiligen Antikörpers in 200 µl 1 x Solubilisierungspuffer zu den Beads gegeben und der Ansatz für 1 Std. bei 4 °C auf einem Rollenschüttler inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper aus dem Ansatz zu entfernen, wurden die Beads einmal mit 1 x Solubilisierungspuffer (inkl. Proteaseinhibitoren und 0,1 % DDM) gewaschen und anschließend ohne weitere Aufbewahrung in der Immunpräzipitation eingesetzt.

3.2.2.8.6 Bindung und Elution gebundener Proteinkomplexe

Die kovalent (3.2.2.8.3) bzw. nicht-kovalent (3.2.2.8.4) an magnetische Beads gekoppelten Antikörper wurden nun mit dem Zellextrakt inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an das Zielprotein erfolgte für 150 Min. bei 4 °C auf einem Rollenschüttler. Anschließend wurde der Zellextrakt mithilfe des magnetischen Ständers entfernt und die Beads 5-mal mit 1 x Solubilisierungspuffer, dem 0,1 % des jeweiligen Detergens zugesetzt waren, gewaschen. Zum Eluieren der Proteinkomplexe vom Antikörper wurden die Beads in ein entsprechendes Volumen an 4 x LDS-Puffer (Invitrogen) und DTT (50 mM) aufgenommen und anschließend für 20 Min. bei 61 °C denaturiert. Die Ansätze konnten nun mit der SDS-PAGE (3.2.2.4) und anschließendem Western Blotting (3.2.2.5) bzw. durch massenspektrometrische Messungen (3.2.3) weiter analysiert werden.

Erfolgte die Antikörper-Affinitätschromatographie mithilfe von ProteinA Agarose (IP1), wurde diese nach Inkubation mit dem Zellextrakt 5-mal durch Mischen mit 1 ml 1 x Solubilisierungspuffer und anschließende Zentrifugation bei 800 x g für 2 Min. gewaschen. Zum Eluieren wurden die Proben hier mit dem entsprechenden Volumen an 2 x Laemmli-Puffer versetzt und anschließend für 20 Min. bei 61 °C denaturiert.

3.2.3 Massenspektrometrische Analyse von TRPC4-Protein-Interaktionen

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren, das es ermöglicht Peptide anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses zu identifizieren. In meiner Arbeit wurde diese Technik verwendet, um die mittels Immunpräzipitation gewonnenen Proteingemische zu analysieren und darin mögliche Interaktionspartner des TRPC4-Kationenkanals zu

identifizieren. Es wurde dabei nach dem „bottom up-Ansatz“ (Chait 2006) verfahren, d.h. die zu identifizierenden Proteine wurden zunächst mit der Protease Trypsin verdaut und die dabei entstehenden Peptide durch das Massenspektrometer analysiert. Durch Abgleich der gemessenen Sequenzen mit bestimmten Datenbanken konnte so das Protein als Ganzes identifiziert werden.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden von Dr. Pascal Schalkowsky und Dr. Claudia Fecher-Trost vorgenommen.

3.2.3.1 Probenvorbereitung mittels Short-SDS-PAGE

Die bei der Immunpräzipitation (3.2.2.8) gewonnenen Proteingemische wurden durch das Verfahren der Short-SDS-PAGE (Berkefeld et al. 2006) für die Massenspektrometrie vorbereitet. Störende Substanzen, wie Puffer oder Detergenzien, können hierbei durch eine kurze Gelelektrophorese und anschließende Waschschrte aus dem Ansatz entfernt werden. Im Einzelnen wurde folgendermaßen verfahren: Die in Laemmli-Puffer bzw. LDS-Puffer de-

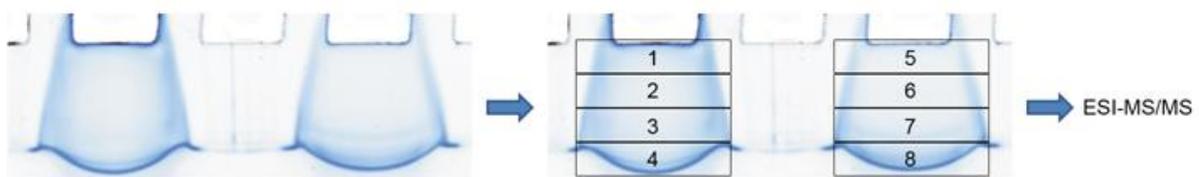


Abbildung 7: Darstellung des Verfahrens der Short-SDS-PAGE.

In Laemmli-Puffer denaturierten Proteinproben werden in die Taschen eines Gradientengeles eingebracht. Nachdem die Proben etwa 1 cm in das Gel eingelaufen sind, wird die Elektrophorese abgebrochen und die Proteine mittels Blue Silver Färbung im Gel sichtbar gemacht. Anschließend werden gefärbte Bereiche ausgeschnitten und in vier gleich große Banden unterteilt. Diese werden zur massenspektrometrischen Analyse vorbereitet.

naturierten Proben (3.2.2.4.2) wurden in die Taschen eines NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels (4-12%) der Firma Invitrogen eingebracht und die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 80 V gestartet. Sobald die Proben etwa 1 cm in das Gel eingelaufen waren, wurde die Elektrophorese abgebrochen und die Proteine im Gel mittels Blue Silver Färbung (3.2.2.7.2) fixiert und sichtbar gemacht. Anschließend wurde der angefärbte Bereich des Gels mithilfe eines Skalpellts ausgeschnitten, in 4 gleich große Banden unterteilt und diese bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.2.3.2 Reduktion und Alkylierung der Proben

Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden zweimal im Wechsel mit 300 µl Lösung A und Lösung B für jeweils 5 Min. bei RT auf einem Schüttler gewaschen. Man konnte dabei beobachten, wie das in Lösung B enthaltene Lösungsmittel Acetonitril die durch Coomassie blauen Gelbanden entfärbte. Gleichzeitig wurden hierbei störende Detergenzien nach und nach ausgewaschen. Im Anschluss wurden im Protein vorhandene Disulfidbrückenbindungen durch 30 Min. Inkubation bei 56 °C in 300 µl DTT-haltiger Reduktionslösung aufgebrochen. Um die Reduktion zu stabilisieren, wurden die Gelbanden 30 Min. bei RT im gleichen Volumen an Alkylierungspuffer inkubiert und die Sulfhydrylgruppen hierbei carbamidomethyliert. Durch alternierendes Waschen mit Lösung A und B wurden die Gelbanden abschließend gänzlich entfärbt, in einer Evaporationszentrifuge getrocknet und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.3.3 „In-Gel-Verdau“ der Proteine durch Trypsin

Bevor die Proteinproben im Massenspektrometer analysiert wurden, wurden diese zunächst in tryptische Peptide gespalten. Die gewaschenen und getrockneten Gelbanden wurden dazu je nach Größe der Bande mit 3-10 µl Trypsinlösung überdeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Protease Trypsin spaltet Proteine C-terminal von Lysin- und Argininresten, sodass für jedes Protein ein charakteristisches Muster an gebildeten Peptiden entsteht.

3.2.3.4 Peptidextraktion aus dem Gel

Nach dem Trypsin-Verdau wurden die Gelbanden mit 20 µl Extraktionslösung bedeckt und für 15 Min. bei RT in ein Ultraschallbad gestellt (35 kHz). Die Peptide diffundierten hierbei aus dem Gelstück heraus in die umliegende Flüssigkeit und wurden zusammen mit dieser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde wiederholt, beide so gewonnenen Überstände vereinigt und diese in einer Evaporationszentrifuge eingedampft. Die nun am Boden des Reaktionsgefäßes eingetrockneten Peptide wurden in 20 µl 0,1 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen und durch 15 Min. Ultraschallbehandlung (35 kHz) in Lösung gebracht. Zuletzt wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße anzentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen zu sedimentieren. 18 µl des Überstandes wurden in ein 1,5 ml Vial (VWR international, Darmstadt) transferiert und dieses bis zur massenspektrometrischen Messung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3.5 Analyse der massenspektrometrischen Daten

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit dem Massenspektrometer Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Die Peptide wurden zunächst durch eine Nano-HPLC ihrer Hydrophobizität nach aufgetrennt und anschließend durch Elektrospray Ionisierung (ESI) in die Gasphase transferiert.

Die während der massenspektrometrischen Analyse anfallenden Daten wurden durch die Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc.) als raw.files aufgezeichnet und anschließend mit dem Algorithmus Mascot unter Verwendung folgender Parameter ausgewertet:

Datenbank: Swissprot (<http://www.uniprot.org/>)

Taxonomie: all entries

Enzym: Trypsin

Maximale Anzahl übersehener Schnittstellen: 2

Dynamische Modifikationen: Deamidierung (Asparagin, Glutamin), Oxidation (Methionin), Acetylierung (Lysin)

Fixe Modifikationen: Carbamidomethylierung (Cystein)

Peptidtoleranz: 7 ppm

Fragmenttoleranz (MS/MS): 0,5 Da

Peptidladung: $\geq +2$

Die durch die Mascot-Datenbanksuche erhaltenen Dateien (dat-files) wurden anschließend in die Software Scaffold (Proteome Software Inc.) geladen. Hier wurden die Signifikanzfilter auf 95 % für Protein- und 90 % für Peptididentifikationen gestellt.

3.2.4 Untersuchung der TRPC4-Proteininteraktionen mithilfe von Glutathion-S-Transferase (GST) getaggtten Fusionsproteinen

Um die Bindung von TRPC4 an die durch die Massenspektrometrie ermittelten putativen Interaktionspartner genauer zu charakterisieren und eine mögliche Bindungsstelle lokalisieren zu können, wurden rekombinante Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine hergestellt. Verschiedene cDNS-Bereiche des TRPC4-Proteins wurden hierbei in den Vektor

pGEX-4T-2 inseriert, der die cDNS des GST-Markerproteins enthält. Die N-terminal mit GST verknüpften TRPC4-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und anschließend über Glutathion-Agarose aufgereinigt. Durch Inkubation der verschiedenen Fusionsproteine mit dem Zellextrakt eines das jeweilige Interaktionsprotein überexprimierenden Zellsystems konnte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen auf einen kurzen Aminosäurebereich eingegrenzt werden (Pulldown-Analyse).

3.2.4.1 Konstruktion von GST-getaggen TRPC4-Fusionsproteinen

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten TRPC4-Fusionsproteine und die zur Herstellung verwendeten Vektoren. Die Konstrukte waren von Lorenz Latta (N-Term), Jasmin Zimmermann (C-Term) und Dr. Claudia Fecher-Trost (Wolf427N, Kozwolf429, mCCE1KO, LB3/4b, bCCE1 470c) in der Arbeitsgruppe kloniert worden.

Das Konstrukt C4FM5 wurde von mir hergestellt. Das entsprechende DNS-Fragment wurde hierbei mit den in Tabelle 5 aufgeführten Oligonukleotiden (CFT1, CFT2) in der PCR (3.2.5.1) amplifiziert, aufgereinigt und in den SmaI-geschnittenen Vektor pGEX-4T-2 ligiert. Zur Amplifikation, Isolierung und Sequenzierung wurde der *E.coli*-Stamm XL1 Blue verwendet.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten TRPC4-Fusionsproteine

Bezeichnung	Bereich des TRPC4-Proteins	Verwendeter Vektor	Größe [kDa]
N-Term	mTRPC4 AS 1-324	pGEX-4T-2	62
C-Term	mTRPC4 AS 621-974	pGEX-4T-2	65
Wolf427N	bTRPC4 AS 1-140	pGEX-4T-2	43
Kozwolf429	bTRPC4 AS 140-239	pGEX-4T-2	38
mCCE1KO	bTRPC4 AS 538-558	pGEX-4T-2	30
LB3/4b	mTRPC4 AS 688-759	pGEX-4T-2	35
C4FM5	bTRPC4 AS 763-856	pGEX-4T-2	37
bCCE1470c	bTRPC4 AS 844-981	pGEX-4T-2	43

3.2.4.2 Expression und Aufreinigung der GST-TRPC4-Fusionsproteine

Zur Expression der TRPC4-Fusionsproteine wurde der *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Zunächst wurde eine 5 ml LB-Medium-Kultur (inkl. Ampicillin) mit transformierten Bakterien angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und

anschließend 500 µl dieser Kultur zum Animpfen einer 50 ml LB-Medium-Kultur (inkl. Ampicillin) verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 50 ml der Bakteriensuspension entnommen und in einen Kolben mit 400 ml LB-Medium (inkl. Ampicillin) überführt. Es wurde erneut bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis die Bakterien zu einer optischen Dichte gemessen bei 578 nm von 0,7-1,0 herangewachsen waren. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde nun der lac-Operator aktiviert und so die Proteinexpression induziert. Die Expression erfolgte unter Schütteln für 3 Std. bei 37 °C. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 Min. bei 6.000 rpm geerntet, das Bakteriensediment in 18 ml 1 x TBS-Puffer (inkl. Proteaseinhibitoren) resuspendiert und die Bakterien durch Ultraschallbehandlung (3-mal 30 Sek.) aufgeschlossen. Durch Zugabe von 1 % TritonX-100, 30 Min. Inkubation bei 4 °C auf einem Rollenschüttler und anschließende Zentrifugation für 20 Min. bei 20.000 x g wurden lösliche Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand, der nun auch die TRPC4-Fusionsproteine enthielt, wurde für 2 Std. mit 1,5 ml Glutathion-Agarose (Protino® Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel) als Chromatographiematerial inkubiert. Anschließend wurde die Agarose 6-mal mit 1 x TBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine aus dem Ansatz zu entfernen, in 3 ml 1 x TBS-Puffer aufgenommen und zu 300 µl-Portionen aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die so aufgereinigten Fusionsproteine bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.4.3 Der GST-Pulldown Versuch zur Charakterisierung der TRPC4-Interaktionen

Zur Durchführung des GST-Pulldown Versuches wurde zunächst wie in 3.2.2.8.2 beschrieben ein Zellextrakt aus stabil mTRPC4 exprimierenden HEK293-Zellen, die zudem mit dem jeweiligen Interaktionsprotein transfiziert worden waren, hergestellt. Als Detergens wurde 1 % Digitonin verwendet. Das Zellextrakt wurde nun mit 12 µg der an Glutathion-Agarose gebundenen TRPC4-Fusionsproteine für 3 Std. bei 4 °C auf einem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Agarose 5-mal mit 1 x Solubilisierungspuffer (inkl. 0,1 % Digitonin und Proteaseinhibitoren) gewaschen, in ein entsprechendes Volumen an 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und der Ansatz für 20 Min. bei 61 °C denaturiert. Die so gewonnenen Proben wurden mittels SDS-PAGE (3.2.2.4) und anschließendem Western Blotting (3.2.2.5) analysiert.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1986 erstmals beschriebene Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von Nukleinsäuren (Mullis et al. 1986). Voraussetzung für ihre Entwicklung war die Entdeckung hitzestabiler DNS-Polymerasen, die an doppelsträngige DNS-Moleküle binden und diese anschließend amplifizieren können. Eine PCR besteht dabei aus 30-40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritten zusammengesetzt ist. Zunächst erfolgt bei 94-98 °C die Denaturierung der zu vervielfältigenden Matrizen-DNS in Einzelstränge. Durch Herabkühlen des Ansatzes können spezifische Oligonukleotide (Primer), welche komplementär zu einem bestimmten DNS-Abschnitt konstruiert wurden, an die DNS binden. Diesen Schritt bezeichnet man als „Annealing“, wobei die dazu benötigte Temperatur abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden ist und deren Schmelztemperatur (T_m) entspricht. Im letzten Schritt, dem Elongationsschritt, wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, sodass nun die DNS-Polymerase die Oligonukleotidprimer in 5'-3'-Richtung verlängern kann und so einen zur Matrizen-DNS komplementären DNS-Strang erzeugt.

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

	Matrizen-DNS
2,5 µl	Oligonukleotidprimer 1 (10 pmol/µl)
2,5 µl	Oligonukleotidprimer 2 (10 pmol/µl)
1,0 µl	dNTPs (10 mM)
10 µl	5 x Puffer
0,5 µl	Polymerase
mit H ₂ O auf 50 µl auffüllen.	

Folgendes Protokoll wurde für die DNS-Amplifikation verwendet:

Funtion	Temperatur	Zeitdauer	
Initiale Denaturierung	98 °C	1 Min.	
Denaturierung	98 °C	5 Sek.	} 25-35 Zyklen
Annealing	$T_M + 3$ °C	10 Sek.	
Elongation	72 °C	20 Sek./kb	
Finale Elongation	72 °C	2 Min.	

Nach der PCR wurde jeweils 1 μ l des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese auf das Vorliegen des gewünschten Fragmentes hin untersucht.

In allen PCR-Ansätzen wurde die PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Sie zeichnet sich zum einen durch eine sehr hohe Prozessivität (1kb/15-30s), zum anderen durch eine sehr geringe Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$) aus.

Für einige Klonierungen wurden Oligonukleotidprimer verwendet, an deren 5'-Ende die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease angehängt worden war. So wurden DNS-Fragmente generiert, die mit dem jeweiligen Restriktionsenzym geschnitten und so entweder in entsprechend vorgeschchnittene Vektoren hineinligiert oder aus bestimmten Plasmiden über das jeweilige Enzym herausgetrennt werden konnten.

3.2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit von Bakterien frei im umgebenden Medium befindliche DNS aufzunehmen.

In meiner Arbeit wurde das Protokoll verwendet, wie es 1989 von Chung et al. beschrieben wurde (Chung et al. 1989). Hierbei fertigt man zunächst einen fraktionierten Ausstrich des XL1-Blue-Bakterienstammes an. Anschließend werden 5 ml antibiotikum-freies LB-Medium mit einer der gewachsenen Kolonien angeimpft und für 16 Std. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wird in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium überführt, in dem man die Bakterien bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,35 bis 0,45 gemessen bei 578 nm heranwachsen lässt. Durch Zentrifugation bei $4.500 \times g$ für 15 Min. pelletiert man die Bakterien, bevor man sie in 10 ml TSS-Puffer resuspendiert. Zuletzt wird die Bakteriensuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße à

300 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um die Kompetenz der hergestellten Bakterien zu bestimmen, wurde ein tiefgefrorenes Aliquot mit 1 µg des Plasmids pBlueskript SK- transformiert. Weitergearbeitet wurde nur mit denjenigen Bakterien, die pro eingesetztem µg Plasmid mehr als 10⁶ Transformanden aufwiesen.

3.2.5.3 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation, also das Einbringen von DNS in kompetente Bakterienstämme, wurde wie von Chung et al. beschrieben (Chung et al. 1989) mittels Hitzeschock durchgeführt.

300 µl kompetente XL1-Blue (3.2.5.2) wurden 15 Min. lang auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 0,01-0,05 µg Plasmid-DNS bzw. 20 µl Ligationsansatz auf die Bakterien gegeben und diese 30 Min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde durch einminütige Inkubation bei 42 °C in einem Heizblock appliziert. Nach weiteren 2 Min. auf Eis wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 Std. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden daraufhin direkt auf einer mit Ampicillin versetzten Agarplatte ausplattiert. Der übrige Ansatz wurde für 5 Min. bei 1.000 x g zentrifugiert, anschließend in 150 µl LB-Medium resuspendiert und dieses Volumen auf einer zweiten Agarplatte verteilt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.5.4 Aufreinigung von Plasmid-DNS

3.2.5.4.1 *Analytische Isolierung von Plasmid-DNS*

Nachdem kompetente Bakterien mit einem Ligationsansatz transformiert worden waren (3.2.5.3), mussten die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien auf das Vorliegen der gewünschten Plasmid-DNS hin untersucht werden. Hierzu wurde die sogenannte „boiling method“ verwendet (Holmes und Quigley 1981).

Zunächst wurden mehrere 5 ml LB-Medium-Kulturen (+ Ampicillin) mit jeweils einer ausgewählten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Jeweils 1 ml dieser Bakteriensuspensionen wurde im nächsten Schritt für 5 Min. bei 6.000 rpm (Tischzentrifuge 1-14, Sigma, München) zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien anschließend in 300 µl STET-L-Puffer resuspendiert. Das Enzym Lysozym in Kombination mit dem im STET-Puffer enthaltenen Detergens Triton-X 100 zerstört hierbei

die bakteriellen Zellmembranen. Nach 10 Min. Inkubation auf Eis, anschließendem Erhitzen für 1 Min. auf 95 °C und erneuter einminütiger Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz für 15 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge 1-14, Sigma, München). Das aus chromosomaler DNS, Proteinen und Zelldebris bestehende Präzipitat wurde nun mithilfe eines autoklavierten Zahnstochers entfernt. Die zu analysierende Plasmid-DNS blieb hierbei im Überstand gelöst und konnte durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 Min. bei 14.000 rpm gefällt werden. Abschließend wurde das Präzipitat mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl RNS-Nuklease-Lösung (40 µg/ml) aufgenommen.

Die so aufgereinigte Plasmid-DNS wurde mithilfe bestimmter Restriktionsendonukleasen geschnitten und die dabei erhaltenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Analyse des Bandenmusters im Agarosegel konnten diejenigen Klone selektiert werden, die die gewünschte Plasmid-DNS enthielten.

3.2.5.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNS

Wurde durch die „boiling method“ (3.2.5.4.1) und anschließende Sequenzierung (SEQ-IT GmbH & Co. KG, Kaiserslautern) nachgewiesen, dass bestimmte Bakterienklone die gewünschte Plasmid-DNS enthielten, konnten diese verwendet werden, um das Plasmid im präparativen Maßstab zu isolieren. Hierzu wurde zunächst eine mit Ampicillin versetzte 400 ml LB-Medium-Kultur mit 1 ml der ursprünglichen 5 ml LB-Medium-Kultur angeimpft und 12 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „Qiagen[®] Plasmid Plus Maxi Kit“ nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNS wurde anschließend photometrisch bestimmt.

3.2.5.5 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNS

Die Konzentration und Reinheit von aufgereinigter Plasmid-DNS wurden photometrisch mithilfe des NanoDrop 1000 (peqlab, Erlangen) ermittelt. 1 µl der Probe wurde dazu auf die Messoberfläche des Gerätes pipettiert. Mithilfe nachfolgender Formel kann durch Messung der Absorption bei 260 nm die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt werden:

$$c = A_{260\text{nm}} \times V \times 50 \mu\text{g/ml}$$

c = DNS-Konzentration in µg/ml, $A_{260\text{ nm}}$ = Absorption bei 260 nm, V = Verdünnungsfaktor

3.2.5.6 Modifizierung von Plasmid-DNS

3.2.5.6.1 *Hydrolyse von Plasmid-DNS*

Plasmid-DNS kann mithilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten oder hydrolysiert werden. Die dazu verwendeten Enzyme wurden ursprünglich aus verschiedensten Bakterienarten isoliert, in denen sie zur Abwehr von Fremd-DNS dienen, die sie anhand des Methylierungsmusters von ihrer eigenen unterscheiden können. Die in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzyme gehören größtenteils dem Typ IIP an und zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus 4-8 Basen bestehende palindromische Sequenzen erkennen und innerhalb dieser schneiden. Die dabei entstehenden DNS-Fragmente können je nach verwendetem Enzym glatte („blunt ends“) oder überstehende Enden („sticky ends“) aufweisen.

Um Plasmid-DNS, die analytisch mithilfe der „boiling method“ (3.2.5.4.1) isoliert worden war, auf das Vorliegen des gewünschten DNS-Fragmentes hin zu untersuchen, wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl	Plasmid-DNS
2 µl	10 x Puffer
0,5 µl	Restriktionsendonuklease
12,5 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde eine Stunde lang bei der optimalen Temperatur des verwendeten Restriktionsenzym inkubiert und anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese (3.2.5.7) analysiert.

Für Plasmid-DNS und durch PCR hergestellte DNS-Fragmente, die durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen zur Klonierung vorbereitet werden sollten, wurden folgender Ansatz gewählt:

1 µg	Plasmid-DNS/PCR-Fragment
2 µl	10 x Puffer
0,5 µl	Restriktionsendonuklease
mit H ₂ O auf 20 µl aufgefüllt.	

Nach einstündiger Inkubation bei optimaler Temperatur wurde der Ansatz mit dem jeweiligen Volumen an 10 x DNS-Auftragepuffer versetzt in die Taschen eines Agarosegels gegeben, aufgetrennt und anschließend mittels Elektroelution und Ethanol-fällung (3.2.5.8 und 3.2.5.9) aufgereinigt.

3.2.5.6.2 Dephosphorylierung von hydrolysiertes Plasmid-DNS

Linearisierte Plasmid-DNS, die mit einer bestimmten Restriktionsendonuklease für die Klonierung geschnitten worden war, musste vor dem Ligationsschritt zunächst dephosphoryliert werden. Die dazu verwendete Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Schwalbach) spaltet den Phosphatrest am 5'-Ende der geschnittenen Plasmid-DNS ab und verhindert dadurch die Rezirkulation des Vektors, ohne dass dabei das gewünschte DNS-Fragment eingefügt worden war.

Folgender Ansatz wurde für die Dephosphorylierung verwendet:

26 µl	in H ₂ O aufgenommene, geschnittene DNS
3 µl	10 x Puffer
1 µl	Antarctic Phosphatase

Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde dem Ansatz erneut 1 µl Antarctic Phosphatase zugesetzt, dieser 30 Min. bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym durch 20 Min. Erhitzen auf 65 °C hitzeinaktiviert. Der nun geschnittene und dephosphorylierte Vektor wurde abschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese, Elektroelution und Ethanol-fällung aufgereinigt.

3.2.5.6.3 Ligation von DNS-Fragmenten zur Herstellung rekombinanter Plasmide

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphatende und dem 3'-OH-Ende von Nukleinsäuren gebildet. Diese durch Ligasen katalysierte Reaktion führt zu einer kovalenten Verknüpfung von DNS-Fragmenten und wurde in meiner Arbeit dazu genutzt, um mittels PCR amplifizierte DNS-Fragmente in hydrolysierte und anschließend dephosphorylierte Vektoren zu inserieren. DNS-Fragment und linearisierte Plasmid-DNS wurden hierbei im Verhältnis 3:1 eingesetzt und folgender Ansatz für die Ligrationsreaktion gewählt:

30 fmol	DNS-Fragment
10 fmol	hydrolysierte, dephosphorylierte Plasmid-DNS
2 µl	10 x Ligase-Puffer
1 µl	T4-DNS-Ligase (New England Biolab, Schwalbach)

mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt.

Nach Inkubation über Nacht bei 16 °C wurden kompetente Zellen mit dem Ansatz transformiert. Mithilfe der „boiling method“ (3.2.5.4.1) und anschließender Hydrolyse der DNS mit Restriktionsendonukleasen wurden Klone selektiert, die das gewünschte DNS-Fragment aufgenommen hatten.

3.2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung linearisierter DNS-Fragmente verschiedener Größe und ggf. anschließender Isolierung aus dem Gel wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die in meiner Arbeit hergestellten DNS-Fragmente wiesen Molekulargewichte zwischen 2 kb und 7 kb auf, sodass 0,8 %-ige Agarosegele eingesetzt wurden.

Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose (0,8 g/100 ml) in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Der Ansatz wurde bis auf etwa 50 °C abgekühlt, mit 0,05 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung 1% versetzt und in einen Gelschlitten mit eingehängtem Kamm gegossen. Sobald die Agarose abgekühlt und so vollständig ausgehärtet war, wurde das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 10 x DNS-Auftragepuffer versetzt und ebenso wie ein DNS-Größenmarker in die Taschen des Agarosegels eingebracht. Die Auftrennung erfolgte bei 135 mA. Um die DNS sichtbar zu machen, wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt. Hierbei wird die Fluoreszenz des in die DNS interkalierten Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 254 nm angeregt.

3.2.5.8 Elektroelution von DNS aus Agarosegelen

DNS-Fragmente, die entweder mittels PCR hergestellt oder mithilfe von Restriktionsendonukleasen aus bestimmten Plasmiden herausgeschnitten worden waren, wurden über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt. Nach ausreichender Auftrennung der DNS-Fragmente im Gel wurde die gewünschte Bande auf einem UV-Tisch identifiziert

und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde das Gelstück zusammen mit 400 µl autoklaviertem 1 x TBE-Puffer in einen Dialyseschlauch (Dialysis Tubing, Sigma, Münschen) überführt, dieser in eine Elektrophoresekammer gelegt und die DNS bei einer Stromstärke von 135 mA für 45 Min. bei 4 °C aus dem Gel eluiert. Der Puffer, der nun die DNS-Fragmente enthielt, wurde daraufhin in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNS mittels Ethanol-fällung (3.2.5.9) konzentriert.

3.2.5.9 Ethanol-fällung von DNS

DNS, die mittels Elektroelution aus einem Agarosegel isoliert worden war (3.2.5.8), wurde anschließend gefällt und danach in einem gewünschten Volumen an sterilem H₂O aufgenommen.

Die DNS enthaltende Lösung wurde hierzu mit 1/10 ihres Volumens 5 M Natriumchlorid-lösung versetzt und der gesamte Ansatz gemischt. In Gegenwart monovalenter Kationen wird DNS unlöslich. Gibt man nun das 2,5-fache Volumen an Ethanol dazu, fällt die DNS aus und kann durch anschließendes Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 30 Min. (Tischzentrifuge 1-14, Sigma) präzipitiert werden. Einmaliges Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol dient abschließend dazu mitpräzipitiertes Salz von der DNS zu entfernen. Das Präzipitat wird nun getrocknet und im gewünschten Volumen an sterilem H₂O aufgenommen.

3.2.6 Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration mittels FURA-2

In meiner Arbeit wurde zur Messung intrazellulärer Kalziumkonzentrationsänderungen transfizierter Zellen der 1985 von Grynkiewicz et al. entwickelte Kalzium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 verwendet (Grynkiewicz et al. 1985). In Anwesenheit von Kalzium verändert FURA-2 sein Absorptionsmaximum von 363 nm im Kalzium-freien Zustand zu 335 nm im Kalzium-gesättigten Zustand. Das Emissionsmaximum bleibt dabei unabhängig von der vorliegenden Kalziumkonzentration bei 510 nm. Üblicherweise regt man FURA-2 alternierend bei 340 nm und 380 nm an und misst die jeweiligen Emissionen bei 510 nm. Der aus beiden Fluoreszenzen gebildete Quotient F_{340}/F_{380} verhält sich dabei proportional zur Konzentration an freien Kalzium-Ionen.

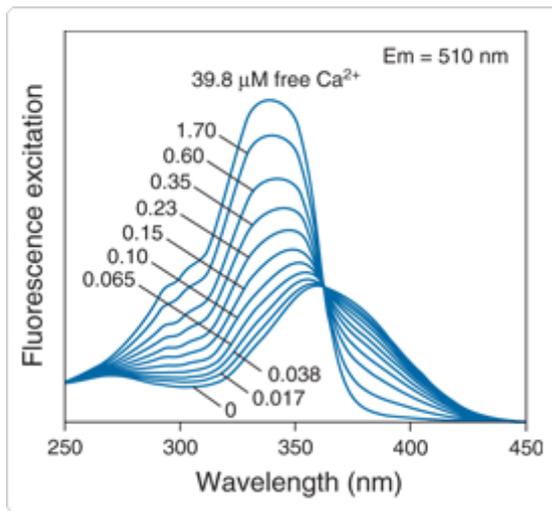


Abbildung 8: Absorptionsspektrum des FURA-2 Farbstoffes bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen.

Durch Bindung von Kalzium verändert FURA-2 sein Absorptionsmaximum von 363 nm (Kalzium-frei) zu 335 nm (Kalzium-gesättigt). Der Quotient F340/F360 ist proportional zur Konzentration an freien Kalzium-Ionen.

Die auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen kultivierten Zellen wurden 30 Min. vor Messungsbeginn in 5 μM FURA-2 AM (Biotium) inkubiert. FURA-2 AM ist eine veresterte und damit unpolare Form des Farbstoffes FURA-2, die die Zellmembran passiert und ins Zytosol gelangt. Dort wird sie durch endogen in der Zelle vorhandene Esterasen zum polaren, Kalzium-sensitiven Farbstoff FURA-2 gespalten, der nun weder die Zelle verlassen noch intrazelluläre Kompartimente penetrieren kann. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FURA-Puffer gewaschen, das Glasplättchen in eine Applikationskammer geklemmt und anschließend mit 200 μl FURA-Puffer überschichtet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss, Germany) wurden nun zunächst durch Anregung bei 480 nm und Einstellung des entsprechenden Filters diejenigen Zellen sichtbar gemacht, die das GFP-Protein exprimierten. So war es möglich Zellen, die transfiziert wurden, von denen zu unterscheiden, die das entsprechende Plasmid nicht aufgenommen hatten. Anschließend wurde die FURA-2-Floureszenz dieser Zellen bei 510 nm (Dicroic:DCLP4010) nach alternierender Anregung bei 340 nm und 380 nm für jeweils 30 ms (Polychrom V, TILL photonics) gemessen. Nach Korrektur des Hintergrundsignales gibt das Verhältnis F340/F380 die zeitabhängige Kalziumkonzentrationsveränderung wieder.

In meiner Arbeit wurde mithilfe des FURA-Farbstoffes der Carbachol-induzierte Kalziumstrom durch den TRPC4-Kanal in HEK293-Zellen bestimmt. Die verwendete HEK293-Zelllinie (HEKC4 α M₂R) exprimierte dabei stabil mTRPC4 und zusätzlich den muskarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 2 (M₂-Rezeptor). Bereits endogen enthalten war weiterhin das Gen für den muskarinischen Rezeptor Typ 3 (M₃-Rezeptor). Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung in Kalzium-freiem FURA-Puffer. Nach 100 Sek. wurde

1 μM Thapsigargin appliziert. Dieses hemmt die Kalzium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums und führt so indirekt zu einer Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher. 600 Sek. nach Messbeginn wurde die Kalziumkonzentration im Medium auf 2 mM angehoben, sodass nun ein Kalziumeinstrom in die Zellen durch die sog. "store-operated channels" erfolgte. Weitere 700 Sek. später, also 1300 Sek. nach Messbeginn, wurde 100 μM Carbachol appliziert. Als Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin aktiviert es den M_2 - und den M_3 -Rezeptor und setzt so eine Signalkaskade in Gang, die über die Aktivierung der Phospholipase C und gleichzeitig $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelter Signalwege zur Aktivierung des TRPC4-Kanals führt.

Zur Auswertung der in den Messungen erhaltenen Daten wurden die Software TILLvisION (TILL Photonics), OriginPro 9.0G und Excel (Microsoft) eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl geeigneter TRPC4-Antikörper

Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch die Kombination aus Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Analyse mögliche Interaktionspartner des TRPC4-Proteins zu identifizieren und deren Einfluss auf die Funktion des Kationenkanals genauer zu charakterisieren. Dazu war es zunächst notwendig, die Methode der Immunpräzipitation zu optimieren, d.h. ein Protokoll zu entwickeln, mit dem das Protein selbst möglichst stark angereichert wird und dabei Interaktionen mit assoziierten Proteinen weitestgehend erhalten bleiben. Voraussetzung für eine ausreichende Anreicherung des TRPC4-Proteins ist es hierbei einen Antikörper zur Verfügung zu haben, der das Protein möglichst spezifisch und sensitiv erkennt.

4.1.1 Untersuchung der Spezifität der verschiedenen TRPC4-Antikörper mithilfe des Western Blotting

Zu Beginn meiner Arbeit lagen in der Arbeitsgruppe verschiedene Antikörper vor, die gegen das TRPC4-Protein von Maus und Rind hergestellt worden waren (siehe Tabelle 2), darunter sowohl mono- als auch polyklonale. Alle Antikörper richten sich gegen C-terminale Bereiche des Proteins. Die verschiedenen Antikörper sollten zunächst auf ihre Spezifität gegenüber dem TRPC4-Protein hin untersucht werden und es sollte überprüft werden, ob sie zur Anreicherung dieses Proteins mittels Immunpräzipitation geeignet sind. Dazu wurden RIPA-Lysate (3.2.2.1) verschiedener TRPC4-enthaltender Zelllinien (stabil mit bTRPC4 transfizierte HEK293-Zellen und SBAC-Zellen) hergestellt, die Proteine in Laemmli-Puffer denaturiert und 30 µg (stabil mit bTRPC4 transfizierte HEK293-Zellen) bzw. 70 µg (SBAC-Zellen) Protein in einem 7 %-igen Gel mittels SDS-PAGE (3.2.2.4) aufgetrennt. Als Kontrolle wurden jeweils 30 µg Protein aus nicht-transfizierten HEK293-Zellen mit im Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese und anschließendem Western Blotting (3.2.2.5) wurde das bTRPC4-Protein mit den unterschiedlichen TRPC4-Antikörpern detektiert. In Abbildung 9 ist zu

erkennen, dass die Antikörper 1091 (A), 706 (B) und 984 (C) unspezifische Proteine auf der Nitrocellulosemembran erkennen, das TRPC4-Protein wird jedoch nicht detektiert.

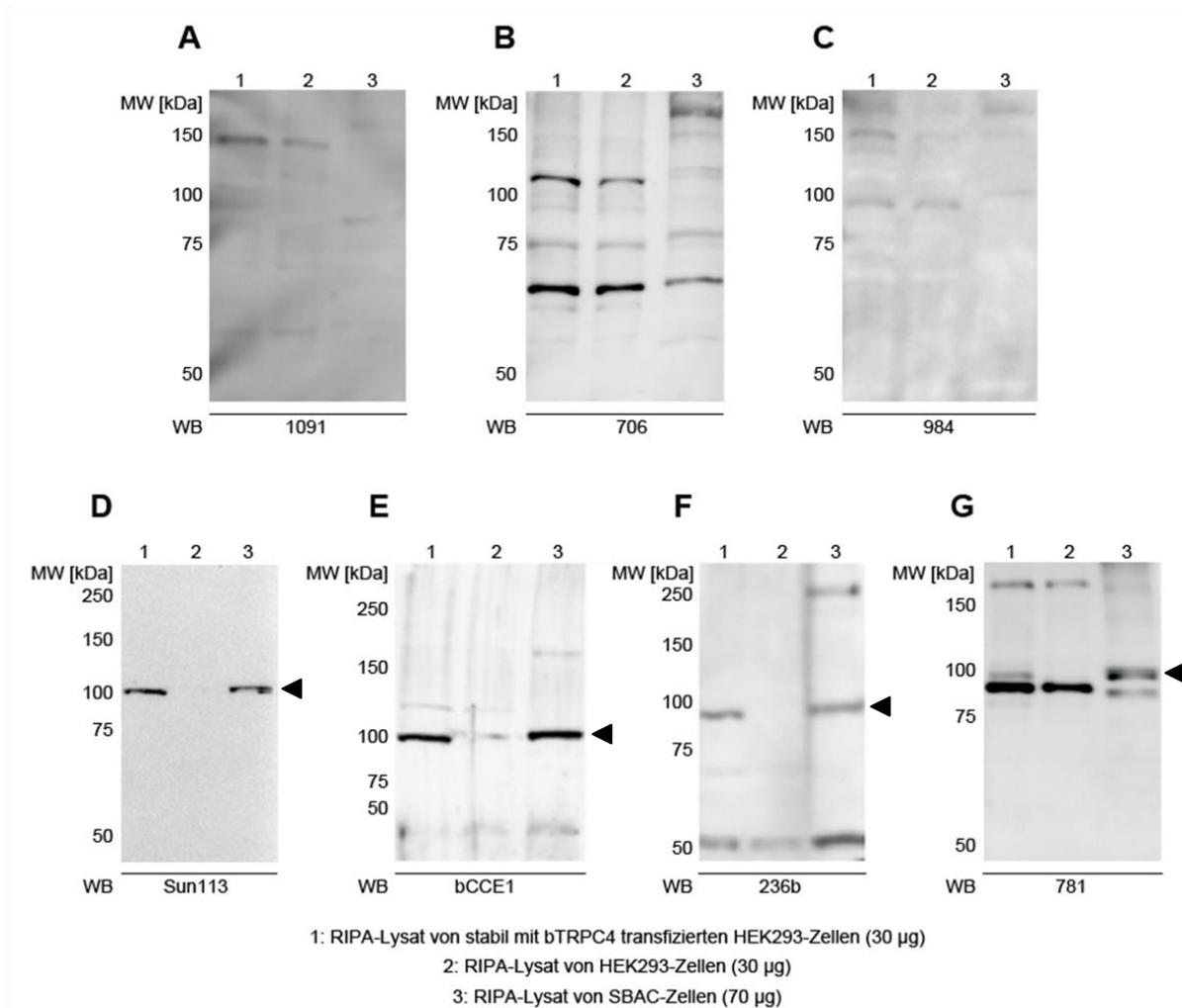


Abbildung 9: Überprüfung der Spezifität verschiedener Antikörper gegenüber dem bTRPC4-Protein mittels Western Blotting.

RIPA-Lysate von stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen (Spur 1, 30 µg) und SBAC-Zellen (Spur 3, 70 µg) wurden in einem 7 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend das bTRPC4-Protein mit verschiedenen Antikörpern detektiert. Zur Kontrolle wurde ein RIPA-Lysat nicht-transfizierter HEK293-Zellen (Spur 2, 30 µg) mitgeführt. Die Antikörper 1091, 706 und 984 erkennen unspezifische Proteine in den Zellysaten, das bTRPC4-Protein wird aber nicht detektiert. Mit den Antikörpern Sun113, bCCE1, 236b und 781 kann das bTRPC4-Protein in den transfizierten HEK293-Zellen und in den SBAC-Zellen nachgewiesen werden (mit einem Pfeil markiert), in der Kontrolle fehlt ein entsprechendes Signal. Antikörper 781 erkennt darüber hinaus aber weitere unspezifische Proteine in den Lysaten, sodass Antikörper Sun113, bCCE1 und 236b am besten geeignet sind zur Detektion des TRPC4-Proteins.

Die Antikörper Sun113 (D), bCCE1 (E) und 236b (F) zeigen sowohl im Lysat der mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen als auch im Lysat der SBAC-Zellen deutliche Signale im Western Blot im Bereich von 100 kDa. Dass eine entsprechende Bande in den nicht-transfizierten HEK293-Zellen fehlt, bestätigt zum einen, dass die oben beschriebenen Signale

auf das TRPC4-Protein zurückzuführen sind, gleichzeitig belegt es die Spezifität der drei Antikörper. Auch Antikörper 781 detektiert das bTRPC4-Protein in den transfizierten HEK293- und in den SBAC-Zellen. Daneben werden aber in allen Zelllysaten, auch in dem der nicht-transfizierten Zellen, weitere unspezifische Proteine im Bereich von 90 kDa erkannt. Die Antikörper Sun113, bCCE1 und 236b sind daher zur spezifischen Detektion des bTRPC4-Proteins am besten geeignet und wurden zu diesem Zweck von mir in den weiteren Versuchen verwendet.

Abbildung 10 zeigt eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des TRPC4-Proteins von Maus, Ratte, Mensch und Rind und die Epitope, die von den Antikörper bCCE1, Sun113 und 236b erkannt werden. Antikörper 236b richtet sich gegen die letzten 14 Aminosäuren am absoluten C-Terminus des bovinen TRPC4-Proteins. Zu sehen ist, dass die Sequenzen von Maus, Ratte, Mensch und Rind in diesem Bereich größtenteils übereinstimmen, sodass der Antikörper 236b auch die TRPC4-Proteine dieser Spezies detektieren sollte. Antikörper bCCE1 wurde durch Immunisierung mit einem 136 Aminosäure-langen Peptid, das ebenfalls dem absoluten C-Terminus des bovinen TRPC4-Proteins entspricht, hergestellt. Auch dieser Antikörper sollte die TRPC4-Proteine der anderen hier gezeigten Spezies erkennen.

Maus	MAQFYKRNVNAPYRDRIPLRIVRAESELSPSEKAYLNAVEKGDYASVKK	50
Ratte	MAQFYKRNVNAPYRDRIPLRIVRAESELSPSEKAYLNAVEKGDYASVKK	50
Mensch	MAQFYKRNVNAPYRDRIPLRIVRAESELSPSEKAYLNAVEKGDYASVKK	50
Rind	MAQFYKRNVNAPYRDRIPLRIVRAESELSPSEKAYLNAVEKGDYASVKK	50

Maus	SLEEAEIYFKININCIDPLGRTALLIAIENENLELIELLLSFNVYVGDAL	100
Ratte	SLEEAEIYFKININCIDPLGRTALLIAIENENLELIELLLSFNVYVGDAL	100
Mensch	SLEEAEIYFKININCIDPLGRTALLIAIENENLELIELLLSFNVYVGDAL	100
Rind	SLEEAEIYFKININCIDPLGRTALLIAIENENLELIELLLSFNVYVGDAL	100

Maus	LHAIRKEVVGAVELLNHHKPSGEKQVPPILLDKQFSEFTPDITPIILAA	150
Ratte	LHAIRKEVVGAVELLNHHKPSGEKQVPPILLDKQFSEFTPDITPIILAA	150
Mensch	LHAIRKEVVGAVELLNHHKPSGEKQVPPILLDKQFSEFTPDITPIILAA	150
Rind	LHAIRKEVVGAVELLNHHKPSGEKQVPPILLDKQFSEFTPDITPIILAA	150

Maus	HTNNEYEIIKLLVQKGVSVPRPHEVRCNCVECVSSSDVDSLHRHSRSLNIY	200
Ratte	HTNNEYEIIKLLVQKGVSVPRPHEVRCNCVECVSSSDVDSLHRHSRSLNIY	200
Mensch	HTNNEYEIIKLLVQKGVSVPRPHEVRCNCVECVSSSDVDSLHRHSRSLNIY	200
Rind	HTNNEYEIIKLLVQKGVSVPRPHEVRCNCVECVSSSDVDSLHRHSRSLNIY	200

Maus	KALASPSLIALSSEDPFLTAFQLSWELQELSKVENEFKSEYEELSRQCKQ	250
Ratte	KALASPSLIALSSEDPFLTAFQLSWELQELSKVENEFKSEYEELSRQCKQ	250
Mensch	KALASPSLIALSSEDPFLTAFQLSWELQELSKVENEFKSEYEELSRQCKQ	250
Rind	KALASPSLIALSSEDPFLTAFQLSWELQELSKVENEFKSEYEELSRQCKQ	250

Maus	FAKDLLDQTRSSRELEIIILNYRDDNSLIEEQSGNDLARLKLAIKYRQKEF	300
Ratte	FAKDLLDQTRSSRELEIIILNYRDDNSLIEEQSGNDLARLKLAIKYRQKEF	300
Mensch	FAKDLLDQTRSSRELEIIILNYRDDNSLIEEQSGNDLARLKLAIKYRQKEF	300
Rind	FAKDLLDQTRSSRELEIIILNYRDDNSLIEEQSGNDLARLKLAIKYRQKEF *****:*****	300
Maus	VAQPNCQQLLASRWYDEFPGWRRRHWAVKMVTCFIIIGLLFPVFSVCYLIA	350
Ratte	VAQPNCQQLLASRWYDEFPGWRRRHWAVKMVTCFIIIGLLFPVFSVCYLIA	350
Mensch	VAQPNCQQLLASRWYDEFPGWRRRHWAVKMVTCFIIIGLLFPVFSVCYLIA	350
Rind	VAQPNCQQLLASRWYDEFPGWRRRHWAVKMVTCFIIIGLLFPVFSVCYLIA *****:*****	350
Maus	PKSPLGLFIRKPFIKFICHTASYLTFLFLLLLASQHIDRSDLNRQGPPT	400
Ratte	PKSPLGLFIRKPFIKFICHTASYLTFLFLLLLASQHIDRSDLNRQGPPT	400
Mensch	PKSPLGLFIRKPFIKFICHTASYLTFLFLLLLASQHIDRSDLNRQGPPT	400
Rind	PKSPLGLFIRKPFIKFICHTASYLTFLFLLLLASQHIDRSDLNRQGPPT *****	400
Maus	IVEWMILPWLGFVIWGEIKQMWGGGLQDYIHDWWNLMDFMNSLYLATIS	450
Ratte	IVEWMILPWLGFVIWGEIKQMWGGGLQDYIHDWWNLMDFMNSLYLATIS	450
Mensch	IVEWMILPWLGFVIWGEIKQMWGGGLQDYIHDWWNLMDFMNSLYLATIS	450
Rind	IVEWMILPWLGFVIWGEIKQMWGGGLQDYIHDWWNLMDFMNSLYLATIS *****	450
Maus	LKIVAFVKYSALNPRESWDMWHPTLVAEALFAIANIFSSLRLISLFTANS	500
Ratte	LKIVAFVKYSALNPRESWDMWHPTLVAEALFAIANIFSSLRLISLFTANS	500
Mensch	LKIVAFVKYSALNPRESWDMWHPTLVAEALFAIANIFSSLRLISLFTANS	500
Rind	LKIVAFVKYSALNPRESWDMWHPTLVAEALFAIANIFSSLRLISLFTANS *****	500
Maus	HLGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGLNQLYFYEEETKGLSCK	550
Ratte	HLGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGLNQLYFYEEETKGLSCK	550
Mensch	HLGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGLNQLYFYEEETKGLTCK	550
Rind	HLGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGLNQLYFYEEETKGLSCK *****:*	550
Maus	GIRCEKQNNAFSTLFETLQSLFWSIFGLINLYVTNVKAQHEFTEFVGATM	600
Ratte	GIRCEKQNNAFSTLFETLQSLFWSIFGLINLYVTNVKAQHEFTDFVGATM	600
Mensch	GIRCEKQNNAFSTLFETLQSLFWSIFGLINLYVTNVKAQHEFTEFVGATM	600
Rind	GIRCEKQNNAFSTLFETLQSLFWSIFGLINLYVTNVKAQHEFTEFVGATM *****:*****	600
Maus	FGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFFARTKLWMSYFEEG	650
Ratte	FGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFFARTKLWMSYFEEG	650
Mensch	FGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFFARTKLWMSYFEEG	650
Rind	FGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFFARTKLWMSYFEEG *****	650
Maus	GTLPTPFNVIPSPKSLWYLVKWIWTHLCKKKMRRKPESFGTIGRRAADNL	700
Ratte	GTLPTPFNVIPSPKSLWYLVKWIWTHLCKKKMRRKPESFGTIGRRAADNL	700
Mensch	GTLPTPFNVIPSPKSLWYLVKWIWTHLCKKKMRRKPESFGTIGRRAADNL	700
Rind	GTLPTPFNVIPSPKSLWYLVKWIWTHLCKKKMRRKPESFGTIGRRAADNL *****:*****	700
Maus	RRHHQYQEVMRNLVKRYVAAMIREAKTEEGLTEENVKELKQDISSFRFEV	750
Ratte	RRHHQYQEVMRNLVKRYVAAMIREAKTEEGLTEENVKELKQDISSFRFEV	750
Mensch	RRHHQYQEVMRNLVKRYVAAMIRDAKTEEGLTEENVKELKQDISSFRFEV	750
Rind	RRHHQYQEVMRNLVKRYVAAMIRDAKTEEGLTEENVKELKQDISSFRFEV *****:*****:*****	750
Maus	LGLLRGSKLSTIQSANAAS----SADSDEKSQSEGNGKDKRKNLSLFDLT	796
Ratte	LGLLRGSKLSTIQSANAASSAS-SADSDEKSHSEGNGKDKRKNLSLFDLT	799
Mensch	LGLLRGSKLSTIQSANASKESSNSADSDEKSDSEGNSKDKKNFSLFDLT	800
Rind	LGLLRGSKLSTVQSAQGTREKSSNSADSDEKSDNEGSSKDKKNFSLFDLT *****:***:..:*****.***:***:*****	800

Maus	TLIHPRSAAIASERHNLSNGSALVVQEPPREKQRKVN FVADIKNFGLFHR	846
Ratte	TLIHPRSAVIASERHNLSNGSALVVQEPPREKQRKVN FVADIKNFGLFHR	849
Mensch	TLIHPRSAAIASERHNI SNGSALVVQEPPREKQRKVN FVTDIKNFGLFHR	850
Rind	TLIHPRSAAI A AERHTISNGSALVVQEPPREKQRKVN FVTDIR HEGLFHR	850
	***** . ** : *** . : ***** : * : * : *****	
Maus	RSKQN-AAEQNANQIFSVSEEITRQQAAGALERNIELESKGLASRGDRSI	895
Ratte	RSKQN-AAEQNANQIFSVSEEITRQQAAGALERNIQLESKGLASRGDRSI	898
Mensch	RSKQN-AAEQNANQIFSVSEEVARQQAAGPLERNIQLESRGLASRGDLSI	899
Rind	RSKQHAAAEQNANQIFSVSEGVARQQAEGPLERSIQLESRTLASRGDLNI	900
	**** : ***** : : ***** * . *** . * : **** : ***** . *	
Maus	PGLNEQCVLVDHRRERNTDTLGLQVGKRVCSFKSEKVVVEDTVPIIPKEK	945
Ratte	PGLNEQCVLVDHRRERNTDTLGLQVGKRVCSFKSEKVVVEDTVPIIPKEK	948
Mensch	PGLSEQCVLVDHRRERNTDTLGLQVGKRVCP-FKSEKVVVEDTVPIIPKEK	948
Rind	PGLSEQCILVDHRRERNTDSLGVQVSKRVCS-FKSEKVVVEDTVPIIPKEK	949
	*** . *** : ***** : * : * . * . * . *****	
Maus	-HAHEEDSSIDYDLSPDTAAHEDYVTTTL	974
Ratte	-HAQEEDSSIDYDLSPDTVAHEDYVTTTL	977
Mensch	-HAKEEDSSIDYDLNLPDVTTHEDYVTTTL	977
Rind	KHAKEDSSADYDANLTDITTHEDYVTTTL	979
	** : ***** * * * . . * * : *****	

Abbildung 10: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des TRPC4-Proteins unterschiedlicher Spezies.

Die Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des TRPC4-Proteins von Maus, Ratte, Mensch und Rind wurde mit ClustalW2 erstellt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*), konservierte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt (:), und semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt (.) gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch ist durch ein Leerzeichen markiert. Die zur Herstellung der Antikörper bCCE1, Sun113 und 236b verwendeten Peptide sind in der Gegenüberstellung grün hinterlegt (bCCE1) bzw. rot (236b) oder blau (Sun113) unterstrichen. Die zugrunde liegenden Sequenzen entsprechen den UniProt-Einträgen Q9QUQ5 (TRPC4_Maus), O35119 (TRPC4_Ratte), Q9UBN4 (TRPC4_Mensch) und P79100 (TRPC4_Rind).

Im nächsten Schritt sollte beispielhaft für die Antikörper bCCE1 und 236b gezeigt werden, dass sie, obwohl sie gegen das bovine TRPC4-Protein hergestellt worden waren, auch zur Detektion und Anreicherung des TRPC4-Proteins anderer Spezies geeignet sind. Dazu wurden Immunpräzipitationen (3.2.2.8) aus mikrosomalen Proteinfractionen aus Rattenhirn (3.2.2.2) von Wildtyp- und TRPC4-Knockout-Tieren angefertigt (IP1). Pro Ansatz wurden 2 mg Hirnmikrosomen eingesetzt, die Proteine mithilfe von 1 % DDM als Detergens solubilisiert und anschließend mit ProteinA Agarose, an die die Antikörper 236b bzw. bCCE1 gekoppelt waren, inkubiert. Nach dem Eluieren der Proteine mit 50 µl 2 x Laemmli-Puffer wurden jeweils 20 µl jedes Ansatzes in einem 7 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Zelllysate von mit mTRPC4 transfizierten COS-Zellen mitaufgetragen. Nach dem Western Blotting wurde das TRPC4-Protein mit dem Antikörper 236b detektiert (Abbildung 11). Sowohl mit Antikörper 236b als auch mit Antikörper bCCE1 kann das TRPC4-Protein mittels Immunpräzipitation aus Rattenhirnmikrosomen von Wildtyp-Tieren angereichert werden. Im Western Blot ist ein entsprechendes Signal im Bereich von 100 kDa zu erkennen und liegt auf gleicher Höhe wie das Signal des TRPC4-Proteins aus mit mTRPC4

transfizierten COS-Zellen. In den Anreicherungen aus Hirnmikrosomen der TRPC4-Knockout-Tiere fehlt eine entsprechende Bande im Western Blot, was die Spezifität der eingesetzten Antikörper belegt.

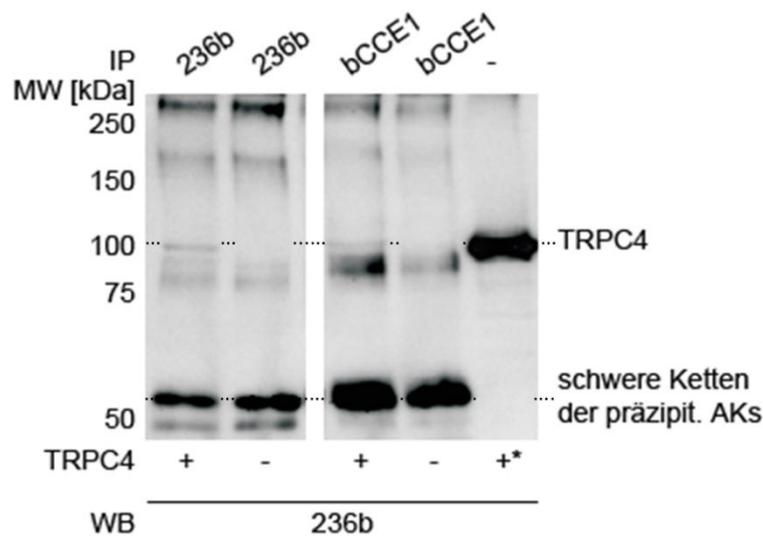


Abbildung 11: Immunpräzipitation aus Hirnmikrosomen von Wildtyp- und TRPC4-Knockout-Tieren mit den Antikörpern bCCE1 und 236b (IP1).

Zu sehen ist ein Western Blot, der mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper 236b entwickelt wurde. Aufgetragen sind 20 µl der Eluate der Immunpräzipitationen mit den Antikörpern 236b und bCCE1 aus Rattenhirnmikrosomen von Wildtyp-Tieren (TRPC4 +) und TRPC4-Knockout-Tieren (TRPC4 -). In der mit “+*” gekennzeichneten Spur sind mit mTRPC4 transfizierte COS-Zellen zur Kontrolle aufgetragen. Sowohl mit Antikörper bCCE1 als auch mit Antikörper 236b kann das TRPC4-Protein aus Rattenhirnmikrosomen von Wildtyp-Tieren spezifisch angereichert werden.

4.2 Immunpräzipitation von TRPC4 und massenspektrometrische Identifizierung

Nachdem aus den in der Arbeitsgruppe vorhandenen TRPC4-Antikörpern diejenigen ausgewählt worden waren, die das Protein spezifisch und sensitiv detektieren, wurden anschließend Immunpräzipitationen aus unterschiedlichen Geweben (Hirngewebe von Maus, mit bTRPC4 transfizierten COS-Zellen, stabil mit bTRPC4 transfizierte HEK293-Zellen, SBAC-Zellen) und unter Verwendung verschiedener Detergenzien (Nonidet P40, Desoxycholat, Digitonin) angefertigt und zunächst versucht in den jeweiligen Anreicherungen das TRPC4-Protein massenspektrometrisch zu identifizieren. Um eine unspezifische Bindung von TRPC4 und möglicher Interaktionspartnern an das Säulenmaterial, die verwendeten

Reaktionsgefäße oder bestimmte Bereiche der Immunglobuline auszuschließen, wurden parallel zu den Immunpräzipitationen mit den TRPC4-spezifischen Antikörpern Anreicherungen mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen (rbIgGs) angefertigt.

4.2.1 Immunpräzipitation von TRPC4 aus mit bTRPC4 transfizierten COS-Zellen

4.2.1.1 Nachweis des präzipitierten TRPC4-Proteins im Gel mithilfe der Silberfärbung

Zunächst sollte das TRPC4-Protein aus COS-Zellen angereichert werden, die mit bovinem TRPC4 (bTRPC4) transfiziert und 48 Std. später geerntet worden waren (IP2). COS-Zellen sind besonders geeignet für Transfektionen und die anschließende Expression des jeweiligen Proteins. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die in der Immunpräzipitation eingesetzten Zellen das TRPC4-Protein in relativ großen Mengen enthielten. Das aus drei Kulturschälchen (3,1 cm Durchmesser) erhaltene Zellpellet wurde in 7,5 ml Solubilisierungspuffer (inkl. Proteaseinhibitoren) aufgenommen, die Proteine mithilfe von 1 % Digitonin in Lösung gebracht (3.2.2.8.2) und mit dem Antikörper 236b bzw. mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs), die kovalent an magnetische Beads gekoppelt waren (3.2.2.8.3), inkubiert. Die Proteine wurden mit LDS-Puffer (Invitrogen) eluiert und in einem Gradientengel (4-12 %) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In Abbildung 12 ist das Gel zu sehen, in dem die Proteine mittels Silberfärbung (3.2.2.7.3) sichtbar gemacht wurden. In der Anreicherung mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper 236b sind zwei Banden (1, 2) im Bereich von 110 kDa zu erkennen, die in der mit Kaninchen-Antikörpern angefertigten Kontrolle fehlen. Es lässt sich daher vermuten, dass sie die in der Immunpräzipitation angereicherten TRPC4-Proteine darstellen.

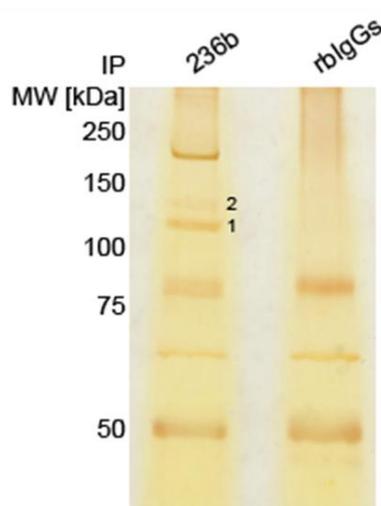


Abbildung 12: Anreicherung des TRPC4-Proteins aus mit bTRPC4 transfizierten COS-Zellen (IP2).

Zu sehen sind Immunpräzipitationen des TRPC4-Proteins aus mit bTRPC4 transfizierten COS-Zellen mit dem Antikörper 236b und unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs). Die Eluate wurden in einem Gradientengel (4-12 %) aufgetrennt und anschließend die Proteine mittels Silberfärbung im Gel sichtbar gemacht. Die mit 1 bzw. 2 markierten Banden wurden ausgeschnitten und der Firma Toplab zur massenspektrometrischen Analyse zugeschickt. In beiden Banden konnte das TRPC4-Protein identifiziert werden.

4.2.1.2 Massenspektrometrische Identifizierung des präzipitierten TRPC4-Proteins

Um die Annahme zu belegen, dass die in Abbildung 12 markierten Banden (1, 2) Anreicherungen des TRPC4-Proteins darstellen, wurden diese ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse der Firma Toplab (Martinsried) zugeschickt. In beiden Proben konnte das TRPC4-Protein eindeutig identifiziert werden. Die Peptide, die aus Bande 1 extrahiert wurden decken 39 % der Aminosäuresequenz des bovinen TRPC4 ab. Mit den aus Bande 2 erhaltenen Peptiden konnte eine Sequenzabdeckung des bovinen TRPC4-Proteins von 35 % erzielt werden. In Abbildung 13 sind die identifizierten Peptide der jeweiligen Probe rot markiert dargestellt.

A

1	MAQFYKRN V	NAPYRDRIPL	RIVRAESEL	PSEKAYLNAV	EKGDYASVKK
51	SLEEAETI YFK	ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELLL	SFNVVVDAL
101	LHAIRKE VVG	AVELLLNHKK	PSGEKQV PPI	LLDKQ FSEPT	PDITPIILAA
151	HTNNY EIIKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE	CVSSSDVDSL	RHSRSRLNIY
201	KALASPSLIA	LSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE	YEELSRQCKQ
251	FAK DLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLLEE	QSGNDLLARK	LAIKYRQKEF
301	VAQNCQQLL	ASRWYDEFPG	WRRRHWAVKM	VTCFIVGLLF	PVFSVCYLIA
351	PKSPLGLFIR	KPFIK FICHT	ASYLT FLFLL	LLASQ HIDRS	DLNRQ GGPPT
401	IVEW MILPWV	LGFIW GEIKQ	MWDG GLQDYI	HDW WNLMDFV	MNSLY LATIS
451	LKIV AFVKYS	ALNPRESWDM	WHPT LVAEAL	FAI ANIFSSL	RLISLFTANS
501	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCL VLLAF	ANGL NQLYFY	YEET KGLSCK
551	GIRCE KQQNA	FSTLFETLQS	LFWSI FGLIN	LYVT NVKAQH	EFT EFVGATM
601	FGTY NVISLV	VLLN MLIAMM	NNSY QLIADH	ADIE WKFART	KLW MSYFEEG
651	GTLPT PFNVI	PSPK SLWYLI	KWI WTHLCKK	KMRR KPESFG	TIGRRAADNL
701	RRHHQYQEVM	RNLVKRYVAA	MIRDAKTEEG	LTEENFKELK	QDISSFRFEV
751	LGLLRGSKLS	TVQSAQGTKE	SSNSADSDEK	SDNEGSSKDK	KKNFSLFDLT
801	TLIHPRSAAI	AAERHTISNG	SALVVQEPPR	EKQRKVNFVT	DIRHFGLFHR
851	RSKQHAAAEQ	NANQIFSVSE	GVARQQAEGP	LERSIQLESR	TLASRGDLNI
901	PGLSEQCILV	DHRERNTDSL	GVQVSKRVCS	FKSEKVVVED	TVPIIPKEKK
951	HAK EEDSSAD	YDANL TDTIT	HEDY VTTRL		

B

1	MAQFYKRN V	NAPYRDRIPL	RIVRAESEL	PSEKAYLNAV	EKGDYASVKK
51	SLEEAETI YFK	ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELLL	SFNVVVDAL
101	LHAIRKE VVG	AVELLLNHKK	PSGEKQV PPI	LLDKQ FSEPT	PDITPIILAA
151	HTNNY EIIKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE	CVSSSDVDSL	RHSRSRLNIY
201	KALASPSLIA	LSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE	YEELSRQCKQ
251	FAK DLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLLEE	QSGNDLLARK	LAIKYRQKEF
301	VAQNCQQLL	ASRWYDEFPG	WRRRHWAVKM	VTCFIVGLLF	PVFSVCYLIA
351	PKSPLGLFIR	KPFIK FICHT	ASYLT FLFLL	LLASQ HIDRS	DLNRQ GGPPT
401	IVEW MILPWV	LGFIW GEIKQ	MWDG GLQDYI	HDW WNLMDFV	MNSLY LATIS
451	LKIV AFVKYS	ALNPRESWDM	WHPT LVAEAL	FAI ANIFSSL	RLISLFTANS
501	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCL VLLAF	ANGL NQLYFY	YEET KGLSCK
551	GIRCE KQQQNA	FSTLFETLQS	LFWSI FGLIN	LYVT NVKAQH	EFT EFVGATM
601	FGTY NVISLV	VLLN MLIAMM	NNSY QLIADH	ADIE WKFART	KLW MSYFEEG
651	GTLPT PFNVI	PSPK SLWYLI	KWI WTHLCKK	KMRR KPESFG	TIGRRAADNL
701	RRHHQYQEVM	RNLVKRYVAA	MIRDAKTEEG	LTEENFKELK	QDISSFRFEV
751	LGLLRGSKLS	TVQSAQGTKE	SSNSADSDEK	SDNEGSSKDK	KKNFSLFDLT
801	TLIHPRSAAI	AAERHTISNG	SALVVQEPPR	EKQRKVNFVT	DIRHFGLFHR
851	RSKQHAAAEQ	NANQIFSVSE	GVARQQAEGP	LERSIQLESR	TLASRGDLNI
901	PGLSEQCILV	DHRERNTDSL	GVQVSKRVCS	FKSEKVVVED	TVPIIPKEKK
951	HAK EEDSSAD	YDANL TDTIT	HEDY VTTRL		

Abbildung 13: Darstellung der in Bande 1 und 2 identifizierten Peptide des bTRPC4-Proteins.

Zu sehen ist die Aminosäuresequenz des bovinen TRPC4-Proteins. Rot markiert sind die Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse (Toplab, Martinsried) der aus Bande 1 (A) und 2 (B) extrahierten Peptide gefunden wurden. Insgesamt liegt eine Sequenzabdeckung von 39 % (A) bzw. 35 % (B) vor, sodass das TRPC4-Protein eindeutig identifiziert ist.

4.2.2 Immunpräzipitation von TRPC4 aus Hirn von Maus

Nachdem das TRPC4-Protein nun aus einem heterologen Zellsystem, den transfizierten COS-Zellen, aufgereinigt und massenspektrometrisch identifiziert worden war, sollte dies im nächsten Schritt aus einem Gewebe wiederholt werden, in dem TRPC4 endogen exprimiert wird. Dazu wurden Immunpräzipitationen mit dem monoklonalen Antikörper Sun113 aus Hirngewebe von Maus angefertigt (IP3) und die erhaltenen Eluate nach Kontrolle im Western Blot massenspektrometrisch ausgewertet. Für die Immunpräzipitation wurde das Hirngewebe von 5 Mäusen eingesetzt, die Proteine wie in 3.2.2.8.1 beschrieben durch die Detergenzien Nonidet P40 und Desoxycholat in Lösung gebracht und anschließend mit dem Antikörper Sun113, der kovalent an magnetische Beads gekoppelt war (3.2.2.8.3), inkubiert. Zur Kontrolle wurden Anreicherungen mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs) parallel angefertigt. 1/10 der erhaltenen Eluate wurden in einem NuPAGE Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt und das TRPC4-Protein nach dem Western Blotting mit dem Antikörper 236b detektiert. In Abbildung 14 ist zu sehen, dass das TRPC4-Protein im Bereich von 100 kDa in dem eingesetzten Gewebeextrakt erkannt wird - ebenso in dem zur Kontrolle aufgetragenen Zelllysate der mit mTRPC4 transfizierter COS-Zellen.

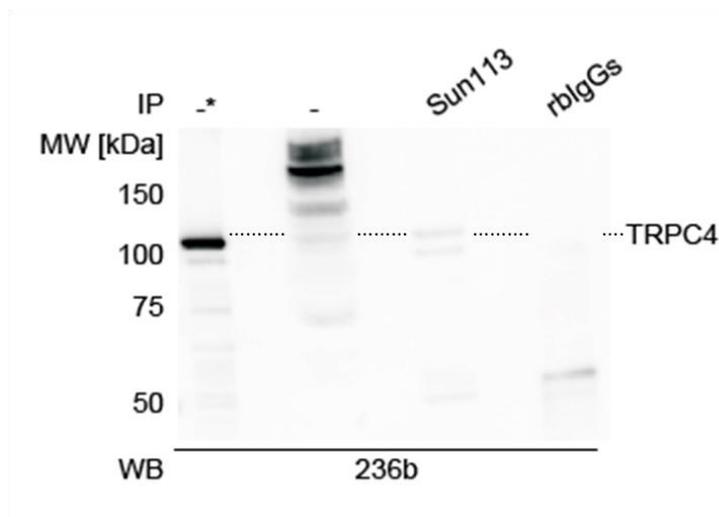


Abbildung 14: Anreicherung des TRPC4-Proteins aus Hirngewebe von Maus (IP3).

Jeweils 1/10 der Eluate der Immunpräzipitationen aus Hirngewebe von Maus mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper Sun113 wurden im Gel (NuPage Gel, 4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt und nach dem Western Blotting mit dem Antikörper 236b inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Lysat von mit mTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen ("IP-*") und ein Teil des in der Immunpräzipitation eingesetzten Gewebeextraktes ("IP-") mitaufgetragen. Das TRPC4-Protein kann sowohl im Zelllysate als auch im Gewebeextrakt und der daraus angefertigten Immunpräzipitation nachgewiesen werden. In der Immunpräzipitation, die zur Kontrolle mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern angefertigt wurde, fehlt ein entsprechendes Signal.

Durch die Immunpräzipitation mit dem Antikörper Sun113, jedoch nicht bei Verwendung der unspezifischen Kaninchen-Immunglobuline, kann das Protein angereichert werden. Die

verbleibenden 9/10 der Eluate wurden nun durch die Short-SDS-PAGE, anschließende Waschschritte und den Verdau mit Trypsin (3.2.3) für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. In der Anreicherung mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper Sun113 konnte hierbei das TRPC4-Protein mit 4 unabhängigen Peptiden identifiziert werden. In der Kontroll-Anreicherung mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern war es hingegen nicht nachweisbar. In Abbildung 15 sind die detektierten Peptide des mTRPC4-Proteins rot dargestellt.

10	20	30	40	50	60
MAQFYKRNV	NAPYRDRIPL	RIVRAESEL	PSEKAYLNAV	EKGDYASVVK	SLEEAIEYFK
70	80	90	100	110	120
ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELL	SFNVYVGDAL	LHAIRKEVVG	AVELLLNHKK
130	140	150	160	170	180
PSGEKQVPPI	LLDKQFSEFT	PDITPIILAA	HTNNYEIIKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE
190	200	210	220	230	240
CVSSSDVDSL	RHSRSLNIY	KALASPSLIA	LSSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE
250	260	270	280	290	300
YEELSRQCKQ	FAKDLLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLIEE	QSGNDLARLK	LAIKYRQKEF
310	320	330	340	350	360
VAQPNCQQLL	ASRWYDFPG	WRRRHAVKM	VTCFIIGLLF	PVFSVCYLIA	PKSPLGLFIR
370	380	390	400	410	420
KPFIKFIHT	ASYLTFLL	LLASQHIDRS	DLNRQGGPPT	IVEWMILPWV	LGFIWGEIKQ
430	440	450	460	470	480
MWDGGLQDYI	HDWWNLDFV	MNSLYLATIS	LKIVAFVKYS	ALNPRESWDM	WHPTLVAEAL
490	500	510	520	530	540
FAIANIFSSL	RLISLFTANS	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCLVLLAF	ANGLNQLYFY
550	560	570	580	590	600
YEETKGLSCK	GIRCEKQNN	FSTLFETLQS	LFWSIFGLIN	LYVTNVKAQH	EFTEFVGATM
610	620	630	640	650	660
FGTYNVISLV	VLLNMLIAMM	NNSYQLIADH	ADIEWKFART	KLWMSYFEEG	GTLPTPFNVI
670	680	690	700	710	720
PSPKSLWYLV	KWIWTHLCKK	KMRRKPESFG	TIGRRAADNL	RRHHQYQEV	RNLVKRYVAA
730	740	750	760	770	780
MIREAKTEEG	LTEENVKELK	QDISSFRFEV	LGLLRGSKLS	TIQSANAASS	ADSDEKSQSE
790	800	810	820	830	840
GNGKDKRKNL	SLFDLTLIHL	PRSAAIASER	HNLSNGSALV	VQEPREKQR	KVNFVADIKN
850	860	870	880	890	900
FGLFHRRSKQ	NAAEQNANQI	FSVSEEITRQ	QAAGALERNI	ELESKGLASR	GDRSIPGLNE
910	920	930	940	950	960
QCVLVDHRER	NTDTLGLQVG	KRVCSTFKSE	KVVVEDTVPI	IPKEKHAHEE	DSSIDYDLSP
970	974				
TDTAAHEDYV	TTRL				

Abbildung 15: Sequenzabdeckung des mTRPC4-Proteins nach Anreicherung mit dem Antikörper Sun113 aus Hirngewebe von Maus (IP3).

Rot markiert sind die aus den Anreicherungen mit Antikörper Sun113 aus Hirngewebe von Maus identifizierten Peptide des TRPC4-Proteins. Die zugrunde liegende Sequenz entspricht UniProt **Q9QUQ5** (TRPC4_Maus).

Trotz eindeutiger Identifizierung des TRPC4-Proteins war es nicht möglich aus denselben Proben putative Interaktionspartner des Proteins zu identifizieren. Offensichtlich wurde TRPC4 nicht ausreichend aus dem Gewebe angereichert, was sich zum einen auf die mangelnde Sensitivität des Antikörpers Sun113 zurückführen lässt, zum anderen auch durch die zu geringe Menge an endogen exprimiertem TRPC4 im Maushirngewebe bedingt sein kann. Aber auch die eingesetzten Detergenzien könnten nicht optimal gewählt sein, um vorhandene Proteininteraktionen zu schützen.

4.2.3 Immunpräzipitation von TRPC4 aus HEK bTRPC4 und SBAC

Der vorhergehende Versuch hatte gezeigt, dass unter Verwendung des Antikörpers Sun113 und der Detergenzien Nonidet P40 und Desoxycholat das TRPC4-Protein selbst angereichert und sowohl im Western Blot als auch massenspektrometrisch identifiziert werden kann. Mögliche Interaktionspartnern des TRPC4-Proteins konnten aber im erhaltenen Eluat nicht nachgewiesen werden. Die Versuchsbedingungen wurden daher wie folgt variiert, um TRPC4 gegebenenfalls stärker anreichern und bessere massenspektrometrische Ergebnisse erzielen zu können. Zur Präzipitation wurde nun der polyklonale Antikörper bCCE1 eingesetzt und das

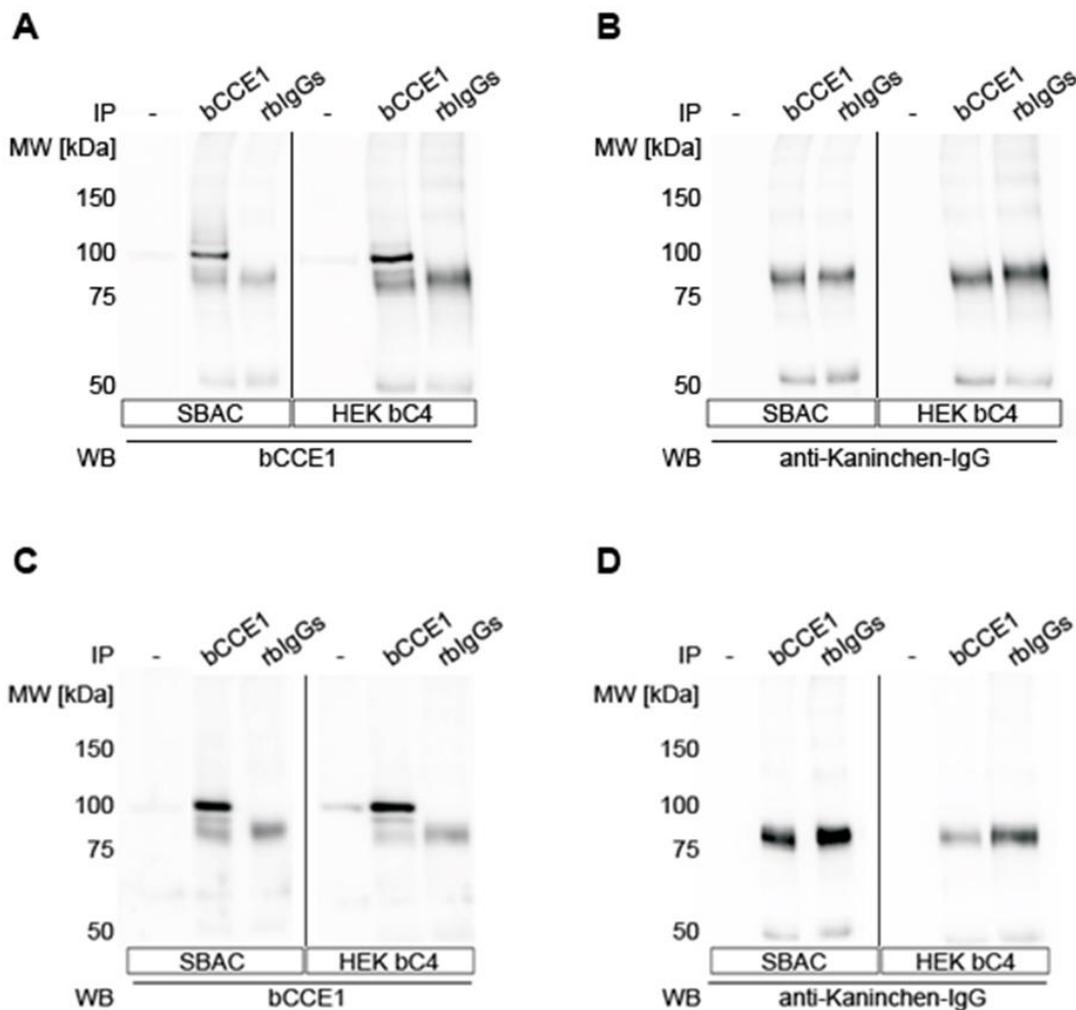


Abbildung 16: Zwei unabhängige Immunpräzipitation des TRPC4-Proteins aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen (IP4, IP5).

(A, C) Das bTRPC4-Protein wurde aus SBAC- bzw. aus stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zelllysaten angereichert und die Eluate in einem 7 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Ein Teil des in der Immunpräzipitation eingesetzten Zelllysates wurde im Gel mitaufgetragen ("IP-"). Zur Kontrolle wurden parallel Immunpräzipitationen mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs) angefertigt. Durch Inkubation mit dem Antikörper bCCE1 wurde nach dem Western Blotting zunächst das TRPC4-Protein detektiert. Anschließend wurden die Antikörper von den Nitrocellulosemembranen entfernt und die Membranen mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-IgGs) entwickelt (B, D). Im Western Blot sind hierbei im Bereich von 75 kDa Signale zu erkennen, die durch die in der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper zustande kommen.

TRPC4-Protein hiermit zum einen aus SBAC-Zellen, einer der Nebennierenrinde des Rindes entstammenden Zelllinie, die TRPC4 endogen exprimiert, zum anderen aus einer stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zelllinie (HEK bC4) angereichert. Als Detergens wurde 1 % Digitonin verwendet, um Proteininteraktionen gegebenenfalls besser schützen zu können.

Mit diesen geänderten Versuchsbedingungen wurden nun zwei unabhängige Anreicherungen des TRPC4-Proteins (IP4, IP5) angefertigt. Die SBAC- bzw. HEK bC4-Zellen wurden hierzu wie in 3.2.2.8.2 beschrieben aufgeschlossen, die Proteine in Lösung gebracht und anschließend mit dem kovalent an magnetische Beads gekoppelten Antikörper bCCE1 inkubiert. Als Kontrolle wurden auch hier parallel Immunpräzipitationen mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs) durchgeführt. 1/10 der erhaltenen Eluate wurden auf ein 7 %-iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach dem Western Blotting der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde durch Inkubation mit Antikörper bCCE1 das TRPC4-Protein detektiert. Abbildung 16 (A, C) zeigt, dass bereits in den Zelllysaten sowohl von SBAC- als auch von HEK bC4-Zellen ("IP-") das TRPC4-Protein im Bereich von 100 kDa nachgewiesen werden kann. Durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper bCCE1 kann das Protein in beiden Immunpräzipitationen (IP4, IP5) deutlich angereichert werden. In den Kontrollen, also den Anreicherungen mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs), fehlt ein entsprechendes Signal. Um die Herkunft der Signale im Bereich von 75 kDa zu klären, wurden im nächsten Schritt die Antikörper von den Nitrocellulosemembranen entfernt (3.2.2.6) und die Membranen mit dem zum entwickeln des Western Blots verwendeten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-IgGs, siehe Tabelle 3) inkubiert (Abbildung 16, B und D). Hierbei werden dieselben Banden im Bereich von 75 kDa erneut sichtbar. Es lässt sich daher annehmen, dass diese Signale durch die in der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper, die durch den Sekundärantikörper detektiert werden, zustande kommen.

4.3 Massenspektrometrische Identifizierung putativer TRPC4-Interaktionspartner

4.3.1 Analyse der massenspektrometrischen Daten

Nachdem mittels Western Blotting nachgewiesen worden war, dass das TRPC4-Protein in den Immunpräzipitation 4 und 5 deutlich und spezifisch angereichert wurde, sollten die erhaltenen

Proben im nächsten Schritt massenspektrometrisch analysiert werden, um darin mögliche Interaktionspartner des TRPC4-Proteins zu identifizieren. Die verbleibenden 9/10 der Eluate wurden dazu mittels Short-SDS-PAGE (3.2.3) vorbereitet. Nach Blue Silver Färbung der Proteine im Gel wurde der angefärbte Bereich ausgeschnitten und in vier Banden unterteilt. Diese wurden durch Waschen von störenden Puffern und Detergenzien gereinigt und die darin enthaltenen Proteine nach Reduktion und Carbamidomethylierung abschließend mittels Trypsin verdaut. Die so erhaltenen Peptide wurden aus dem Gel extrahiert und mittels ESI-MS analysiert. Die vom LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer erzeugten Dateien (raw-files) wurden mit dem Mascot-Algorithmus ausgewertet und die hierbei erzeugten Ergebnisse (dat-files) in die Software Scaffold geladen.

Tabelle 9 gibt einen Überblick darüber, wie viele Proteine in den jeweiligen Anreicherungen mit mindestens zwei unabhängigen Peptiden identifiziert wurden. In den spezifischen Immunpräzipitationen mit Antikörper bCCE1 wurden insgesamt zwischen 36 und 131 Proteine erkannt. Das TRPC4-Protein ist dabei in jeder der spezifischen Anreicherungen detektierbar. Gleichzeitig wurde es aber in keiner der Kontrollen nachgewiesen.

Tabelle 9: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von IP4 und IP5.

IP	Zelllinie	Antikörper	Anzahl identifizierter Proteine (*)	Anzahl an TRPC4-Peptiden
IP 4	HEK bC4	bCCE1	36	4
		Kaninchen-IgG	28	-
	SBAC	bCCE1	38	7
		Kaninchen-IgG	28	-
IP 5	HEK bC4	bCCE1	70	3
		Kaninchen-IgG	12	-
	SBAC	bCCE1	131	21
		Kaninchen-IgG	41	-

* Ein Protein ist eindeutig identifiziert, wenn mindestens zwei unabhängige Peptide gefunden werden.

Abbildung 17 zeigt die in den Immunpräzipitationen 4 und 5 aus SBAC- bzw. HEK bC4-Zellen identifizierten Peptide des TRPC4-Proteins. Die Anzahl an detektierten unabhängigen Peptiden liegt hierbei zwischen 3 (IP5 aus HEK bC4) und 21 (IP5 aus SBAC).

		10	20	30	40	50	60
IP4 HEK bTRPC4	MAQFYKRN	NAPYRDRIPL	RIVRAESELS	PSEKAYLNAV	EKGDYASVKK	SLEEAEIYFK	
IP4 SBAC	MAQFYKRN	NAPYRDRIPL	RIVRAESELS	PSEKAYLNAV	EKGDYASVKK	SLEEAEIYFK	
IP5 HEK bTRPC4	MAQFYKRN	NAPYRDRIPL	RIVRAESELS	PSEKAYLNAV	EKGDYASVKK	SLEEAEIYFK	
IP5 SBAC	MAQFYKRN	NAPYRDRIPL	RIVRAESELS	PSEKAYLNAV	EKGDYASVKK	SLEEAEIYFK	
		70	80	90	100	110	120
IP4 HEK bTRPC4	ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELLL	SFNVYVGDAL	LHAIRKEVVG	AVELLLNHKK	
IP4 SBAC	ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELLL	SFNVYVGDAL	LHAIRKEVVG	AVELLLNHKK	
IP5 HEK bTRPC4	ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELLL	SFNVYVGDAL	LHAIRKEVVG	AVELLLNHKK	
IP5 SBAC	ININCIDPLG	RTALLIAIEN	ENLELIELLL	SFNVYVGDAL	LHAIRKEVVG	AVELLLNHKK	
		130	140	150	160	170	180
IP4 HEK bTRPC4	PSGEKQVPI	LLDKQFSEFT	PDITPIILAA	HTNNYEI IKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE	
IP4 SBAC	PSGEKQVPI	LLDKQFSEFT	PDITPIILAA	HTNNYEI IKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE	
IP5 HEK bTRPC4	PSGEKQVPI	LLDKQFSEFT	PDITPIILAA	HTNNYEI IKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE	
IP5 SBAC	PSGEKQVPI	LLDKQFSEFT	PDITPIILAA	HTNNYEI IKL	LVQKGVSVPR	PHEVRCNCVE	
		190	200	210	220	230	240
IP4 HEK bTRPC4	CVSSSDVDSL	RHSRSRLNIY	KALASPSLIA	LSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE	
IP4 SBAC	CVSSSDVDSL	RHSRSRLNIY	KALASPSLIA	LSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE	
IP5 HEK bTRPC4	CVSSSDVDSL	RHSRSRLNIY	KALASPSLIA	LSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE	
IP5 SBAC	CVSSSDVDSL	RHSRSRLNIY	KALASPSLIA	LSSEDPFLTA	FQLSWELQEL	SKVENEFKSE	
		250	260	270	280	290	300
IP4 HEK bTRPC4	YEELSRQCKQ	FAKDLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLEE	QSGNDLARLK	LAIKYRQKEF	
IP4 SBAC	YEELSRQCKQ	FAKDLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLEE	QSGNDLARLK	LAIKYRQKEF	
IP5 HEK bTRPC4	YEELSRQCKQ	FAKDLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLEE	QSGNDLARLK	LAIKYRQKEF	
IP5 SBAC	YEELSRQCKQ	FAKDLDQTR	SSRELEIILN	YRDDNSLEE	QSGNDLARLK	LAIKYRQKEF	
		310	320	330	340	350	360
IP4 HEK bTRPC4	VAQPNQQLL	ASRWYDEFPG	WRRRHAVKVM	VTCFIVGLLF	PVFSVCYLIA	PKSPLGLFIR	
IP4 SBAC	VAQPNQQLL	ASRWYDEFPG	WRRRHAVKVM	VTCFIVGLLF	PVFSVCYLIA	PKSPLGLFIR	
IP5 HEK bTRPC4	VAQPNQQLL	ASRWYDEFPG	WRRRHAVKVM	VTCFIVGLLF	PVFSVCYLIA	PKSPLGLFIR	
IP5 SBAC	VAQPNQQLL	ASRWYDEFPG	WRRRHAVKVM	VTCFIVGLLF	PVFSVCYLIA	PKSPLGLFIR	
		370	380	390	400	410	420
IP4 HEK bTRPC4	KPFIKFICHT	ASYLTFLELL	LLASQHIDRS	DLNRQGPPT	IVEWMILPWV	LGFIWGEIKQ	
IP4 SBAC	KPFIKFICHT	ASYLTFLELL	LLASQHIDRS	DLNRQGPPT	IVEWMILPWV	LGFIWGEIKQ	
IP5 HEK bTRPC4	KPFIKFICHT	ASYLTFLELL	LLASQHIDRS	DLNRQGPPT	IVEWMILPWV	LGFIWGEIKQ	
IP5 SBAC	KPFIKFICHT	ASYLTFLELL	LLASQHIDRS	DLNRQGPPT	IVEWMILPWV	LGFIWGEIKQ	
		430	440	450	460	470	480
IP4 HEK bTRPC4	MWDGGLQDYI	HDWWNLMDFV	MNSLYLATIS	LKIVAFVKYS	ALNPRESWDM	WHPTLVAEAL	
IP4 SBAC	MWDGGLQDYI	HDWWNLMDFV	MNSLYLATIS	LKIVAFVKYS	ALNPRESWDM	WHPTLVAEAL	
IP5 HEK bTRPC4	MWDGGLQDYI	HDWWNLMDFV	MNSLYLATIS	LKIVAFVKYS	ALNPRESWDM	WHPTLVAEAL	
IP5 SBAC	MWDGGLQDYI	HDWWNLMDFV	MNSLYLATIS	LKIVAFVKYS	ALNPRESWDM	WHPTLVAEAL	
		490	500	510	520	530	540
IP4 HEK bTRPC4	FAIANIFSSL	RLISLFTANS	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCLVLLAF	ANGLNQLYFY	
IP4 SBAC	FAIANIFSSL	RLISLFTANS	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCLVLLAF	ANGLNQLYFY	
IP5 HEK bTRPC4	FAIANIFSSL	RLISLFTANS	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCLVLLAF	ANGLNQLYFY	
IP5 SBAC	FAIANIFSSL	RLISLFTANS	HLGPLQISLG	RMLLDILKFL	FIYCLVLLAF	ANGLNQLYFY	
		550	560	570	580	590	600
IP4 HEK bTRPC4	YEETKGLSCK	GIRCEKQNN	FSTLFETLQS	LFWSIFGLIN	LYVTNVKAQH	EFTEFVGATM	
IP4 SBAC	YEETKGLSCK	GIRCEKQNN	FSTLFETLQS	LFWSIFGLIN	LYVTNVKAQH	EFTEFVGATM	
IP5 HEK bTRPC4	YEETKGLSCK	GIRCEKQNN	FSTLFETLQS	LFWSIFGLIN	LYVTNVKAQH	EFTEFVGATM	
IP5 SBAC	YEETKGLSCK	GIRCEKQNN	FSTLFETLQS	LFWSIFGLIN	LYVTNVKAQH	EFTEFVGATM	
		610	620	630	640	650	660
IP4 HEK bTRPC4	FGTYNVISLV	VLLNMLIAMM	NNSYQLIADH	ADIEWKFART	KLWMSYFEEG	GTLPTPFNVI	
IP4 SBAC	FGTYNVISLV	VLLNMLIAMM	NNSYQLIADH	ADIEWKFART	KLWMSYFEEG	GTLPTPFNVI	
IP5 HEK bTRPC4	FGTYNVISLV	VLLNMLIAMM	NNSYQLIADH	ADIEWKFART	KLWMSYFEEG	GTLPTPFNVI	
IP5 SBAC	FGTYNVISLV	VLLNMLIAMM	NNSYQLIADH	ADIEWKFART	KLWMSYFEEG	GTLPTPFNVI	
		670	680	690	700	710	720
IP4 HEK bTRPC4	PSPKSLWYLI	KWIWTHLCKK	KMRRKPESFG	TIGRRAADNL	RRHHQYQEV	RNLVKRYVAA	
IP4 SBAC	PSPKSLWYLI	KWIWTHLCKK	KMRRKPESFG	TIGRRAADNL	RRHHQYQEV	RNLVKRYVAA	
IP5 HEK bTRPC4	PSPKSLWYLI	KWIWTHLCKK	KMRRKPESFG	TIGRRAADNL	RRHHQYQEV	RNLVKRYVAA	
IP5 SBAC	PSPKSLWYLI	KWIWTHLCKK	KMRRKPESFG	TIGRRAADNL	RRHHQYQEV	RNLVKRYVAA	
		730	740	750	760	770	780
IP4 HEK bTRPC4	MIRDAKTEEG	LTEENFKELK	QDISSFRFEV	LGLLRGSKLS	TVQSAQGTKE	SSNSADSDEK	
IP4 SBAC	MIRDAKTEEG	LTEENFKELK	QDISSFRFEV	LGLLRGSKLS	TVQSAQGTKE	SSNSADSDEK	
IP5 HEK bTRPC4	MIRDAKTEEG	LTEENFKELK	QDISSFRFEV	LGLLRGSKLS	TVQSAQGTKE	SSNSADSDEK	
IP5 SBAC	MIRDAKTEEG	LTEENFKELK	QDISSFRFEV	LGLLRGSKLS	TVQSAQGTKE	SSNSADSDEK	

	790	800	810	820	830	840
IP4 HEK bTRPC4	SDNEGSSKDK	KKNFSLFDLT	TLIHPRSAAI	AAERHTISNG	SALVVQEPPR	EKQRKVNFT
IP4 SBAC	SDNEGSSKDK	KKNFSLFDLT	TLIHPRSAAI	AAERHTISNG	SALVVQEPPR	EKQRKVNFT
IP5 HEK bTRPC4	SDNEGSSKDK	KKNFSLFDLT	TLIHPRSAAI	AAERHTISNG	SALVVQEPPR	EKQRKVNFT
IP5 SBAC	SDNEGSSKDK	KKNFSLFDLT	TLIHPRSAAI	AAERHTISNG	SALVVQEPPR	EKQRKVNFT
	850	860	870	880	890	900
IP4 HEK bTRPC4	DIRHFGLFHR	RSKQHAAAEQ	NANQIFSVSE	GVARQQAEGP	LERSIQLESR	TLASRGDLNI
IP4 SBAC	DIRHFGLFHR	RSKQHAAAEQ	NANQIFSVSE	GVARQQAEGP	LERSIQLESR	TLASRGDLNI
IP5 HEK bTRPC4	DIRHFGLFHR	RSKQHAAAEQ	NANQIFSVSE	GVARQQAEGP	LERSIQLESR	TLASRGDLNI
IP5 SBAC	DIRHFGLFHR	RSKQHAAAEQ	NANQIFSVSE	GVARQQAEGP	LERSIQLESR	TLASRGDLNI
	910	920	930	940	950	960
IP4 HEK bTRPC4	PGLSEQCILV	DHRERNTDSL	GVQVSKRVCS	FKSEKVVVED	TVPIIPKEKK	HAKEDSSAD
IP4 SBAC	PGLSEQCILV	DHRERNTDSL	GVQVSKRVCS	FKSEKVVVED	TVPIIPKEKK	HAKEDSSAD
IP5 HEK bTRPC4	PGLSEQCILV	DHRERNTDSL	GVQVSKRVCS	FKSEKVVVED	TVPIIPKEKK	HAKEDSSAD
IP5 SBAC	PGLSEQCILV	DHRERNTDSL	GVQVSKRVCS	FKSEKVVVED	TVPIIPKEKK	HAKEDSSAD
	970	979				
IP4 HEK bTRPC4	YDANLDTTIT	HEDYVTTRL				
IP4 SBAC	YDANLDTTIT	HEDYVTTRL				
IP5 HEK bTRPC4	YDANLDTTIT	HEDYVTTRL				
IP5 SBAC	YDANLDTTIT	HEDYVTTRL				

Abbildung 17: Sequenzabdeckung des TRPC4-Proteins aus IP4 und IP5.

Die Peptide, die massenspektrometrisch in den Eluaten von IP4 und IP5 aus SBAC- bzw. HEK bC4-Zellen identifiziert wurden, sind rot dargestellt. Die zugrunde liegende Sequenz entspricht dem Uniprot-Eintrag **P79100** (TRPC4_Rind).

Neben dem TRPC4-Protein wurden in den spezifischen Anreicherungen - wie bereits oben erwähnt - weitere Proteine gefunden (Tabelle 9). Durch Vergleich dieser Proteine mit den in den Kontrollen identifizierten konnten solche Proteine erkannt werden, die aufgrund einer unspezifischen Bindung an das Säulenmaterial, die verwendeten Reaktionsgefäße oder Bereiche der eingesetzten Antikörper mitangereichert wurden. Proteine, die hingegen nur in den spezifischen Anreicherungen identifiziert wurden, nicht in den Kontrollen, wurden aufgrund ihrer Interaktion mit TRPC4 mitangereichert und stellen daher putative Interaktionspartner des TRPC4-Proteins dar. Folgende Kriterien wurden von uns aufgestellt, um aus der Liste an gefundenen Proteinen mögliche Interaktionspartner des TRPC4-Proteins auszuwählen: das jeweilige Protein durfte in keiner der Kontroll-Anreicherungen identifiziert werden bzw. darin höchstens mit einem unabhängigen Peptid gefunden werden. Zusätzlich musste es in beiden Anreicherungen derselben Zelllinie (SBAC- oder HEK bC4-Zellen) mit mindestens zwei unabhängigen Peptiden nachweisbar sein oder aber speziesübergreifend in mindestens drei der spezifischen Anreicherungen egal welcher Zelllinie vorhanden sein. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass neben TRPC4 selbst 13 der gefundenen Proteine diese Kriterien erfüllten. Der Signifikanzfilter der zur Auswertung verwendeten Software Scaffold wurde auf 95 % gesetzt, das heißt ein Protein musste mit dieser Wahrscheinlichkeit erkannt werden, um als eindeutig identifiziert zu gelten.

In Abbildung 18 werden zwei Proteine mit besonders vielen unabhängigen Peptiden identifiziert und sind daher besonders interessant bei der Identifizierung möglicher TRPC4-

Interaktionspartner. Zum einen das "Fryl-Protein" oder "Protein furry homolog-like" mit einem Molekulargewicht von 340 kDa. Dieses Protein wird in allen spezifischen Anreicherungen sowohl aus SBAC- als auch aus HEK bC4-Zellen mit einer Anzahl unabhängiger Peptide zwischen 3 (IP5 aus HEK bC4) und 18 (IP5 aus SBAC) identifiziert. Gleichzeitig ist es in keiner der Kontrollen nachweisbar. Ein zweites Protein, das Liprin-beta-1, wird nur in den spezifischen Anreicherungen aus SBAC-Zellen gefunden. Hier ist es allerdings mit einer Anzahl identifizierter unabhängiger Peptide von 8 (IP4) und 17 (IP5) bei einem Molekulargewicht von 109 kDa deutlich angereichert. Gleichzeitig wird es ebenfalls in keiner der Kontrollen nachgewiesen.

Im Folgenden sollen diese durch die Massenspektrometrie gefundenen Interaktionen zwischen TRPC4 und Fryl bzw. TRPC4 und Liprin-beta-1 in weiteren Experimenten bestätigt und näher charakterisiert werden.

Identifiziertes Protein	UniProt	MW	IP 4 (bCCE1)		IP 5 (bCCE1)		IP 4 (rbIgGs)		IP 5 (rbIgGs)	
			HEK bC4	SBAC	HEK bC4	SBAC	HEK bC4	SBAC		
1 Short transient receptor potential channel 4 OS=Bos taurus GN=TRPC4 PE=2 SV=2	TRPC4_BOVIN	112 kDa	4	3	7	21				
2 Protein furry homolog-like OS=Homo sapiens GN=FRYL PE=1 SV=2	FRYL_HUMAN	340 kDa	16	3	12	18				
3 Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=1 SV=2	HSP7C_BOVIN (+6)	71 kDa	3	9	1	16	1			
4 Ankyrin repeat domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=ANKRD17 PE=1 SV=3	ANKRD17_HUMAN	274 kDa	1	2	3	11				
5 Liprin-beta-1 OS=Mus musculus GN=Ppfbp1 PE=1 SV=3	LIPB1_MOUSE	109 kDa			8	17				
6 KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2 OS=Bos taurus GN=KANK2 PE=2 SV=1	KANK2_BOVIN	92 kDa	1		6	15				
7 Myoferlin OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1	MYOF_HUMAN	235 kDa			2	9				
8 Serotransferrin OS=Oryctolagus cuniculus GN=TF PE=1 SV=4	TRFE_RABIT	77 kDa			6	2			1	
9 Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	C1R_HUMAN (+2)	80 kDa			2	2				
10 Protein PRRC2A OS=Homo sapiens GN=PRRC2A PE=1 SV=3	PRRC2A_HUMAN (+1)	229 kDa	2	2						
11 Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1	NUDC_HUMAN	38 kDa	4		2	1				
12 A-kinase anchor protein 13 OS=Homo sapiens GN=AKAP13 PE=1 SV=2	AKP13_HUMAN	308 kDa	2	2		1				
13 Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1a PE=2 SV=2	HSP71_RAT	70 kDa	3	7		7				
14 Alpha-2-macroglobulin OS=Bos taurus GN=A2M PE=1 SV=2	A2MG_BOVIN	168 kDa		2	2	2		1	1	

Abbildung 18: Auflistung massenspektrometrisch identifizierter, putativer TRPC4-Interaktionspartner.

Zu sehen ist eine Auflistung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine der IP4 und IP5 aus SBAC- bzw. HEK bTRPC4-Zellen, die die Kriterien eines putativen TRPC4-Interaktionspartners erfüllen. Der Signifikanzfilter der zur Auswertung eingesetzten Software Scaffold wurde hierbei auf 95 % gesetzt. Grün hinterlegt ist die Anzahl an identifizierten, unabhängigen Peptiden.

4.3.2 Bestätigung der TRPC4-Interaktionen mit Fryl und Liprin-beta-1 durch Ko-Immunpräzitationen

Die massenspektrometrisch nachgewiesenen Interaktionen des TRPC4-Proteins mit Fryl (in SBAC- und transfizierten HEK293-Zellen) und Liprin-beta-1 (in SBAC-Zellen) sollten nun mittels Ko-Immunpräzitation bestätigt werden. Dazu wurden zunächst die Zellsysteme verwendet, in denen die Interaktion ursprünglich nachgewiesen worden war, also die stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen und die SBAC-Zellen. In der Western Blot Kontrolle der IP5 (Abbildung 16, C) war das mit dem Antikörper bCCE1 angereicherte TRPC4-Protein bereits detektiert worden. In Abbildung 19 (oben) ist dieser Versuch nochmals gezeigt. Dieselbe Membran wurde nun von den gebundenen Antikörpern gereinigt (3.2.2.6) und anschließend mit einem gegen das Fryl-Protein gerichteten Antikörper (A302-644A) inkubiert (Abbildung 19, unten).

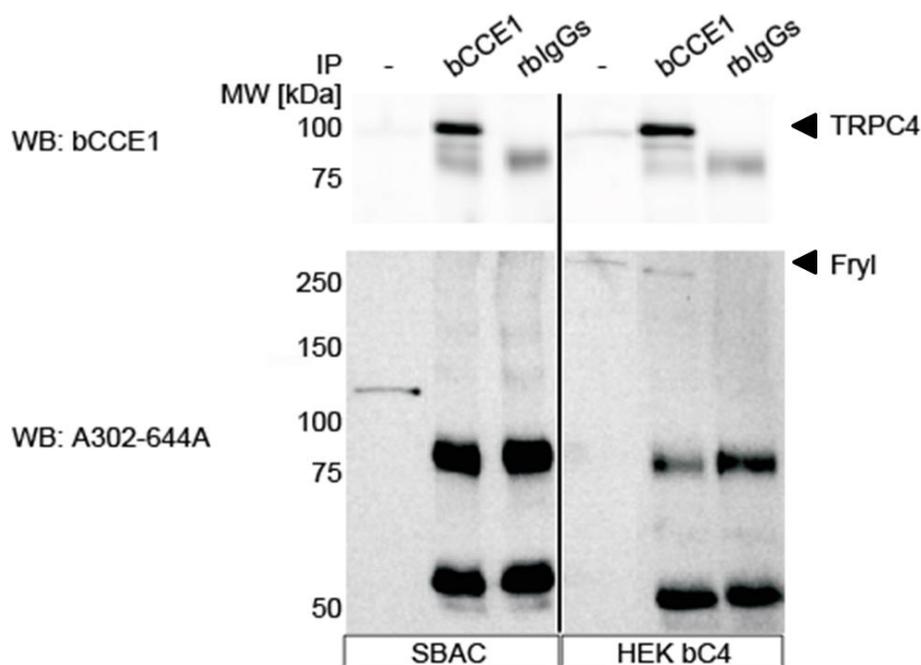


Abbildung 19: Ko-Immunpräzitation von TRPC4 und Fryl aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen.

In der Western Blot Kontrolle der IP5 wurde das TRPC4-Protein mit dem Antikörper bCCE1 in den eingesetzten Zelllysaten von SBAC- und HEK bC4-Zellen ("IP-") und in den spezifischen Anreicherungen detektiert (oben). Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und diese mit dem Fryl-spezifischen Antikörper A302-644A inkubiert (unten). Im Lysat und in der Immunpräzitation aus SBAC-Zellen kann das Fryl-Protein nicht nachgewiesen werden. In den HEK bC4-Zellen wird das Fryl-Protein hingegen sowohl im Zelllysate als auch im Eluat der Immunpräzitation des TRPC4-Proteins erkannt.

Zu sehen ist, dass das Fryl-Protein sehr schwach bei einem Molekulargewicht von über 250 kDa im Zelllysate der HEK bC4-Zellen nachgewiesen werden kann. Diese Zelllinie

scheint das Protein endogen zu exprimieren. Aber auch in der Immunpräzipitation mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper bCCE1 aus derselben Zelllinie ist ein Signal im Bereich von 340 kDa zu erkennen. Bei einer spezifischen Anreicherung von TRPC4 wird offensichtlich also das Fryl-Protein mitangereichert. Durch Vergleich mit der Kontrolle (rbIgGs), in der kein entsprechendes Signal detektierbar ist, kann gleichzeitig ausgeschlossen werden, dass Fryl unspezifisch an z.B. das Säulenmaterial oder die verwendeten Antikörper bindet. Fryl und TRPC4 scheinen einen Proteinkomplex zu bilden, der bei spezifischer Anreicherung von TRPC4 bestehen bleibt und daher massenspektrometrisch und im Western Blot nachgewiesen werden kann. Im Lysat der SBAC-Zellen und den daraus angefertigten Immunpräzipitationen kann zumindest im Western Blot kein Hinweis darauf gefunden werden, dass Fryl enthalten ist und dieses mit dem TRPC4-Protein interagiert, obwohl in dieser Probe Fryl massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.

Auch die Interaktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1, die massenspektrometrisch in Anreicherungen aus SBAC-Zellen nachgewiesen wurde, sollte mittels Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden. Dazu wurden von der Western Blot Kontrolle der IP5 (Abbildung 16, C) erneut gebundene Antikörper abgelöst und diese nun mit einem gegen Liprin-beta-1 gerichteten Antikörper (13961-1AP) inkubiert.

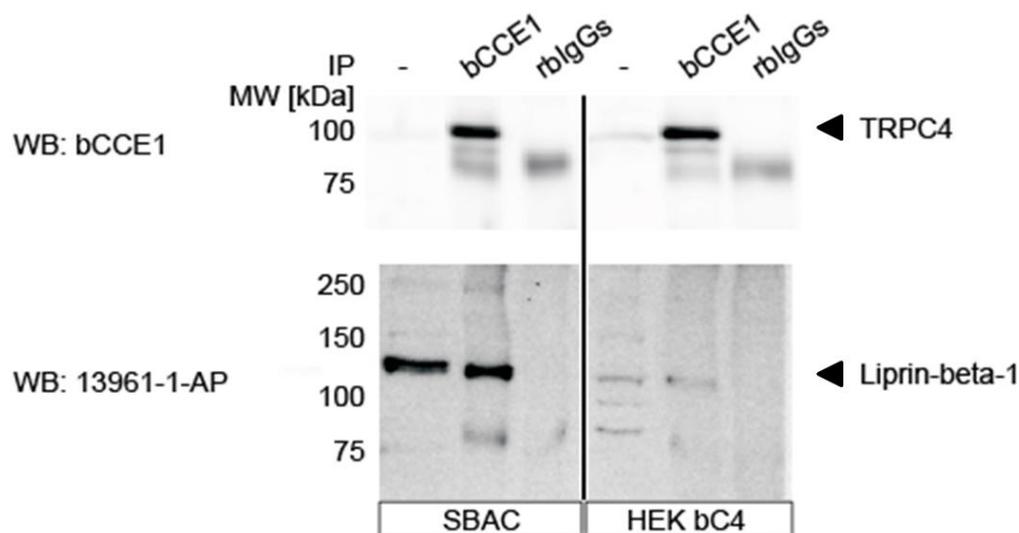


Abbildung 20: Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Liprin-beta-1 aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen.

Zu sehen ist die Western Blot Kontrolle der IP5, in der TRPC4 in den Zelllysaten ("IP-") und den spezifischen Anreicherungen ("bCCE1") detektiert wurde (oben). Von der Membran wurden gebundene Antikörper abgelöst und diese mit dem gegen Liprin-beta-1 gerichteten Antikörper 13961-1-AP inkubiert (unten). Im Lysat und in den spezifischen Anreicherungen sowohl aus SBAC- als auch aus HEK bC4-Zellen kann Liprin-beta-1 nachgewiesen werden.

Der obere Teil von Abbildung 20 zeigt erneut das mit dem Antikörper bCCE1 detektierte TRPC4-Protein. In dem unteren Teil der Abbildung ist zu sehen, dass Liprin-beta-1 in den Zelllysaten von SBAC- und transfizierten HEK293-Zellen mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa nachgewiesen werden kann, beide Zelllinien exprimieren dieses Protein offensichtlich endogen. Auch in den TRPC4-spezifischen Anreicherungen wird Liprin-beta-1 erkannt, wohingegen in den unspezifischen Anreicherungen (rbIgGs) ein entsprechendes Signal fehlt. Durch Ko-Immünpräzipitation kann also auch hier die spezifische Interaktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1, die massenspektrometrisch in SBAC-Zellen erkannt worden war, belegt werden und sogar auch in HEK bC4-Zellen, in denen massenspektrometrisch keine Interaktion nachgewiesen werden konnte, gezeigt werden.

4.4 Klonierungsexperimente

Um die Interaktion zwischen TRPC4 und Fryl bzw. Liprin-beta-1 in weiteren unabhängigen Experimenten zu bestätigen und gegebenenfalls eine funktionelle Bedeutung dieser Protein-Wechselwirkungen zu charakterisieren, sollten zunächst die cDNS-Moleküle von Fryl und Liprin-beta-1 kloniert werden. Obwohl die Interaktionen ursprünglich in SBAC- bzw. in stabil bTRPC4 exprimierenden HEK293-Zellen nachgewiesen worden war, sollte im Folgenden mit den Proteinen von Maus (mFryl bzw. mLiprin-beta-1) weitergearbeitet werden. Hier bestehen bereits TRPC4-defiziente Mausmodelle, die in weiteren Versuchen zur Charakterisierung der Interaktionen herangezogen werden könnten.

4.4.1 Klonierung der cDNS von Liprin-beta-1 von Maus in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP

Mithilfe von spezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 5) wurde die cDNS von Liprin-beta-1 mittels PCR amplifiziert (3.2.5.1). An das 5'-Ende der cDNS wurde die Kozak-Sequenz angehängt, um eine bessere Proteinexpression zu gewährleisten. Die als Matrize verwendete cDNS-Bibliothek war aus Hirngewebe von Maus hergestellt und von PD Ulrich Wissenbach zur Verfügung gestellt worden.

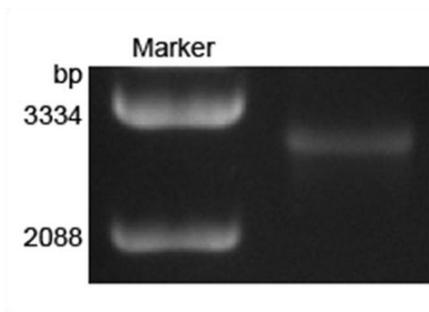


Abbildung 21: Amplifizierung der cDNS von mLiprin-beta-1 aus einer cDNS-Bibliothek von Hirngewebe von Maus.

Mithilfe spezifischer Oligonukleotide wurde die cDNS von mLiprin-beta-1 amplifiziert. Im 0,8 %-igen Kontroll-Agarosegel ist eine entsprechende Bande mit einer Größe von 2910 bp zu erkennen.

1 µl des PCR-Ansatzes wurde zur Kontrolle in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die cDNS von mLiprin-beta-1 weist eine Länge von 2910 bp auf. Eine Bande mit einer entsprechenden Größe ist im Kontrollgel (Abbildung 21) zu erkennen. Der übrige PCR-Ansatz wurde ebenfalls in die Taschen eines Agarosegels eingebracht, elektrophoretisch getrennt und die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die enthaltene DNS wurde anschließend elektroeluiert (3.2.5.8), gefällt (3.2.5.9) und in das mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnittene Plasmid pCAGGS-IRES-GFP ligiert (3.2.5.6.3). Durch Sequenzierung wurde abschließend bestätigt, dass es sich bei dem klonierten DNS-Fragment um die cDNS des mLiprin-beta-1-Proteins handelt.

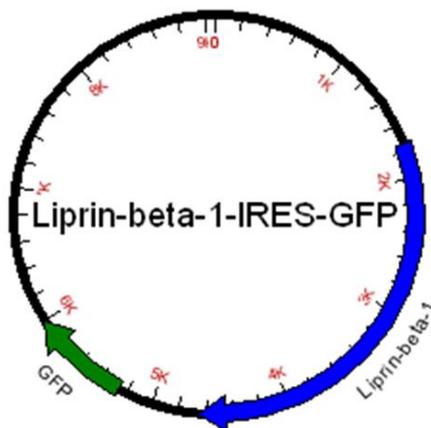


Abbildung 22: Schematische Darstellung des generierten Plasmids Liprin-beta-1-IRES-GFP.

Gezeigt ist das ca. 9000 bp große Plasmid Liprin-beta-1-IRES-GFP. Blau markiert ist die klonierte cDNS von mLiprin-beta-1. In grün dargestellt ist die Sequenz des GFP-Proteins.

Abbildung 22 zeigt schematisch den Aufbau des etwa 9000 bp großen Plasmids Liprin-beta-1-IRES-GFP. Bevor es für Transfektionen eingesetzt wurde, wurde es zunächst im präparativen Maßstab isoliert (3.2.5.4.2).

In Abbildung 23 sind die Aminosäuresequenzen des Liprin-beta-1-Proteins von Maus, Rind und Mensch gegenübergestellt. Zusätzlich ist die Aminosäuresequenz des durch Expression des Vektors Liprin-beta-1-IRES-GFP erhaltenen Proteins dargestellt (Maus*). Diese unterscheidet sich in zwei Aminosäuren von der Referenzsequenz der NCBI-Datenbank (L zu P; D zu E). Beide Aminosäureaustausche sind jedoch in der NCBI-Datenbank bereits vorbeschrieben.

Maus*	MMSDASDMLAAALEQMDGIIA--GSKALEYSNGIFDCQSPTSPFMGSLRALHLVEDLRGL	58
Maus	MMSDASDMLAAALEQMDGIIA--GSKALEYSNGIFDCQSPTSPFMGSLRALHLVEDLRGL	58
Rind	MMSDASDMLAAALEQMDGIIADLGSKALEYSNGIFDCQSPTSPFMGSLRALHLVEDLRGL	60
Mensch	MMSDASDMLAAALEQMDGIIA--GSKALEYSNGIFDCQSPTSPFMGSLRALHLVEDLRGL *****	58
Maus*	LEMMETDEKEGLRCQIPDSTAIEVLI EWLNQMTNGHLPNGDVYQERLARLENDKESLVL	118
Maus	LEMMETDEKEGLRCQIPDSTAIEVLI EWLNQMTNGHLPNGDVYQERLARLENDKESLVL	118
Rind	LEMMEADEKEGLRCQIPDSTAIEVLI EWLNQMTNGHLPNGDVYQERLARLENDKESLVL	120
Mensch	LEMMETDEKEGLRCQIPDSTAIEVLI EWLNQMTNGHLPNGDVYQERLARLENDKESLVL *****:*****.*:*****.*****	118
Maus*	QVSVLTDQVEAQGEKIRDLEFCLEEHREKLNATEEMLQQEELSRTSLETQKLELMAEISN	178
Maus	QVSVLTDQVEAQGEKIRDLEFCLEEHREKLNATEEMLQQEELSRTSLETQKLELMAEISN	178
Rind	QVSVLTDQVEAQGEKIRDLEFCLEEHREKLNATEEMLQQEELSRTSLETQKLDLMAEISN	180
Mensch	QVSVLTDQVEAQGEKIRDLEFCLEEHREKLNATEEMLQQEELSRTSLETQKLDLMAEISN *****:*****:*****:*****	178
Maus*	LKLKLTAVEKDRLDYEDRFRDTEGLIQEINDLRLKVNEMDGERLQYEKCLKSTK-----	232
Maus	LKLKLTAVEKDRLDYEDRFRDTEGLIQEINDLRLKVNEMDGERLQYEKCLKSTK-----	232
Rind	LKLKLTAVEKDRLDYEDRFRDTEGLMQEINDLRLRVSEMENERLQYEKCLKSTKSLMAKL	240
Mensch	LKLKLTAVEKDRLDYEDKFRDTEGLIQEINDLRLKVNEMDGERLQYEKCLKSTKSLMAKL *****:*****:*****.*:***.*:*****	238
Maus*	-----DELASLKEQLEEKECEVKRLQERLVCKAKGEGIEV	267
Maus	-----DELASLKEQLEEKECEVKRLQERLVCKAKGEGIEV	267
Rind	SSMKIKVGMQYEQRMEQKWSLKEELTSLKEQLEEKESEVRRLOEKLVCKMKGEGIEI	300
Mensch	SSMKIKVGMQYEQRMEQKWSLKEELTSLKEQLEEKESEVRRLOEKLVCKMKGEGVEI :***.*****.*:***:***:***:***:***	298
Maus*	LDRDIEVQKMKKAVESLMAANEKERRKIEDLRQCLSRKMQDPAVLAQGDSECEGLFH	327
Maus	LDRDIEVQKMKKAVESLMAANEKERRKIEDLRQCLSRKMQDPAVLAQGDSECEGLFH	327
Rind	LDRDIEVQKMKKAVESLMAANEKERRKIEDLRQCLNRYKMQETVVLAPSQDGFEDLLP	360
Mensch	VDRDIEVQKMKKAVESLMAANEKERRKIEDLRQCLNRYKMQETVVLAPSQDGFEDLLN :*****:*****.*:***:***:***:***:***	358
Maus*	SSSISTLLDAQGFSDLERSTSTPVMGSPSRDPLHTSAPEEFHTSVLQASIPSLPPSVD	387
Maus	SSSISTLLDAQGFSDLERSTSTPVMGSPSRDPLHTSAPEEFHTSVLQASIPSLPPSVD	387
Rind	SSSFSTLLDAQGFSDLEKNLSPTPVGRSPSHDPFNNTSAPEEFHTSVLQASIPSLPPASKG	420
Mensch	SSSISLLDAQGFSDLEKSPSPTPVMGSPSCDPFNNTSVPEEFHTTILQVSIPLPPATVS ***:***:*****:*.*** ** ** * :*:***:***:***:***:***:***	418
Maus*	↓ VETCEKPKLPTKPEFSFEEDGRAILGAAAEVSLSDGVSTSSLQKSSSLGNLKKESDGE	446
Maus	VDTCEKPKLPTKPEFSFEEDGRAILGAAAEVSLSDGVSTSSLQKSSSLGNLKKESDGE	446
Rind	LETSEKAKLPSKPEFPFEESDE--IGSAAETQLCDSLATSSLQKSSSLGNLKKESDGE	477
Mensch	METSEKSKLTPKPEFSFEENDGNIILGATVDTQLCDKLLTSSLQKSSSLGNLKKESDGE :*.***.***.***.***.* :*:***:***:***:***:***:***	478
Maus*	-----TDKAPTDSRTFGTLPPKVPGHEASVDDNPFGRKARSSFGRGFFKIKSGKRT	498
Maus	-----TDKAPTDSRTFGTLPPKVPGHEASVDDNPFGRKARSSFGRGFFKIKSGKRT	498
Rind	KESIPKPSKEDKAPVESPPFGTLPPKAPGHASGDDNPFGRKARSSFGRGFFKIKSNKRT	537
Mensch	KETIQKTSSEDRAPAESRPFGLPPRPPGQDTSMDNPFGRKRVSSFGRGFFKIKSNKRT *:***:***:*****:***:***:***:*****.*****.*****.*	538
Maus*	ASAPNLAETEKETAEHLNLAGTS-RSKGSQGTSPFPMPSPSPDRKKSARGIMRFLGKLRR	557
Maus	ASAPNLAETEKETAEHLNLAGTS-RSKGSQGTSPFPMPSPSPDRKKSARGIMRFLGKLRR	557
Rind	ASAPNLAETEKETAEHLNLAGTS-RSKGSQGTSPFPMPSPSPDRKKSARGIMRFLGKLRR	597
Mensch	ASAPNLAETEKETAEHLNLAGTS-RSKGSQGTSPFPMPSPSPDRKKSARGIMRFLGKLRR *****:***:***.* ** ** * :*:***:***:***:***:***:***	598
Maus*	SQSTTFNPDMDSEPEFKRGGTRATAGPRLGWSRDLGQNSDLMPFAKWTKEQVCSWLAE	617
Maus	SQSTTFNPDMDSEPEFKRGGTRATAGPRLGWSRDLGQNSDLMPFAKWTKEQVCSWLAE	617
Rind	SQSTTFNPDMDSEPEFKRGGTRATAGPRLGWSRDLGQNSDLMPFAKWTKEQVCSWLAE	657
Mensch	SQSTTFNPDMDSEPEFKRGGTRATAGPRLGWSRDLGQNSDLMPFAKWTKEQVCSWLAE *****.* *****:***.* ** *	658
Maus*	QGLGSYLSSGKHWIISGQTLQASQQDLEKELGKIKHSLHRKKLQALQALGSEETNYGK	677
Maus	QGLGSYLSSGKHWIISGQTLQASQQDLEKELGKIKHSLHRKKLQALQALGSEETNYGK	677
Rind	QGLGSYLSGKHWIISGQTLQASQQDLEKELGKIKHSLHRKKLQALQALGSEETNHGK	717
Mensch	QGLGSYLSGKHWIISGQTLQASQQDLEKELGKIKHSLHRKKLQALQALGSEETNHGK *****.* *****:***:***:***:***:***:***	718

Maus*	LDFNWVTRWLDLDDIGLPQYKTQFDEGRVDGRMLHYMTVDDLLSLKVVSVLHHLHSIKRAIQV	737
Maus	LDFNWVTRWLDLDDIGLPQYKTQFDEGRVDGRMLHYMTVDDLLSLKVVSVLHHLHSIKRAIQV	737
Rind	LDFNWVTRWLDLDDIGLPQYKTQFDEGRVDGRMLHYMTVDDLLSLKVVSVLHHLHSIKRAIQV	777
Mensch	LDFNWVTRWLDLDDIGLPQYKTQFDEGRVDGRMLHYMTVDDLLSLKVVSVLHHLHSIKRAIQV *****	778
Maus*	LRINNFEPNCLRRRPSDENSI TPSEVQQWTNHRVMEWLRSDLAEYAPNLRGSGVHGGLM	797
Maus	LRINNFEPNCLRRRPSDENSI TPSEVQQWTNHRVMEWLRSDLAEYAPNLRGSGVHGGLM	797
Rind	LRINNFEPNCLRRRPSDENSI TPSEVQQWTNHRVMEWLRSDLAEYAPNLRGSGVHGGLM	837
Mensch	LRINNFEPNCLRRRPSDENSI TPSEVQQWTNHRVMEWLRSDLAEYAPNLRGSGVHGGLM *****:*.*****:*****:*****	838
Maus*	VLEPRFNVEVETMAQLLNIPPNKTLRRHLATHFNLLIGAEAQHQKRDAMELDPDYVLLTATA	857
Maus	VLEPRFNVEVETMAQLLNIPPNKTLRRHLATHFNLLIGAEAQHQKRDAMELDPDYVLLTATA	857
Rind	VLEPRFNVEVETMAQLLNIPPNKTLRRHLATHFNLLIGAEAQHQKRDAMELDPDYVLLTATA	897
Mensch	VLEPRFNVEVETMAQLLNIPPNKTLRRHLATHFNLLIGAEAQHQKRDAMELDPDYVLLTATA *****.*****	898
Maus*	KVKPKKLTFSNFGNLRKKKHEDGEEYVCPMELGQASG-SSQKGFRLPGLDMRLYEEDDLDR	916
Maus	KVKPKKLTFSNFGNLRKKKHEDGEEYVCPMELGQASG-SSQKGFRLPGLDMRLYEEDDLDR	916
Rind	KVKPKKLTFSNFGNLRKKKHEDGEEYVCPMELGQASGGTSKKGFKPLDVRLYDEDDDLDR	957
Mensch	KVKPKKLTAFSNFGNLRKKKHEDGEEYVCPMELGQASGSASKKGFKPLDVRLYDEDDDLDR *****.*****.*****:*.***.***.***.***.***	958
Maus*	LEQMEDSEGTVRQIGAFSEGINNLTHMLKEDDMFKDFAARSPSASITDEDSNV	969
Maus	LEQMEDSEGTVRQIGAFSEGINNLTHMLKEDDMFKDFAARSPSASITDEDSNV	969
Rind	LEQMEDSEGTVRQIGAFSEGINNLTHMLKEDDMFKDFAARSPSASITDEDSNV	1010
Mensch	LEQMEDSEGTVRQIGAFSEGINNLTHMLKEDDMFKDFAARSPSASITDEDSNV *****	1011

Abbildung 23: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz des Liprin-beta-1-Proteins von Maus, Rind und Mensch sowie des generierten Proteins.

Mit ClustalW2 erstellte Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des Liprin-beta-1-Proteins von Maus, Rind und Mensch sowie der Aminosäuresequenz des durch Expression des Vektors Liprin-beta-1-IRES-GFP generierten Proteins (Maus*). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*), konservierte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt (:), und semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt (.) gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch ist durch ein Leerzeichen markiert. Rot markiert sind die beiden Aminosäuren des generierten Proteins, die sich von der Referenzsequenz der NCBI-Datenbank unterscheiden. Die zugrunde liegenden Sequenzen entsprechen den UniProt-Einträgen Q8C8U0 (LIPB1_Maus), F1MQQ8 (F1MQQ8_Rind) und Q86W92 (LIPB1_Mensch).

4.4.1.1 Überprüfung der Expression von mLiprin-beta-1 in transfizierten HEK293-Zellen mittels Western Blotting

Mit dem Konstrukt Liprin-beta-1-IRES-GFP wurden stabil mTRPC4 exprimierende HEK293-Zellen (HEK mC4-Zellen) transfiziert (3.2.1.4). Es sollte hierbei untersucht werden, ob und in welchem Maße das Liprin-beta-1-Protein von den transfizierten Zellen gebildet wird. 48 Std. nach Transfektion wurde ein Kulturschälchen (3,1 cm Durchmesser) dieser Zellen geerntet und in 150 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und enthaltene Proteine durch Erhitzen auf 61 °C für 20 Min. denaturiert. Als Kontrolle wurde parallel ein Kulturschälchen nicht-transfizierter HEK mC4-Zellen geerntet und in gleicher Weise behandelt. Verschiedene Mengen der Ansätze wurden in die Taschen eines 8 %-igen SDS-Gels eingebracht und elektrophoretisch getrennt. Nach

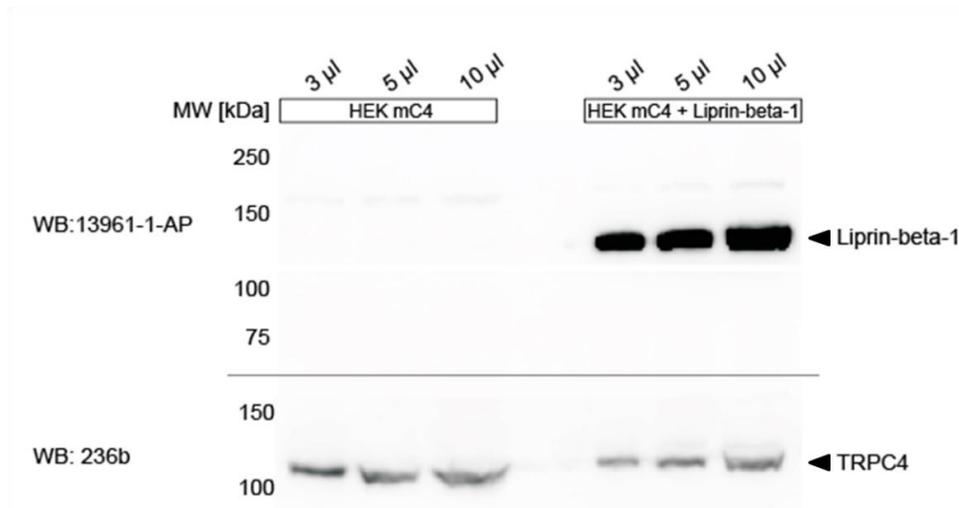


Abbildung 24: Überprüfung der Proteinexpression von Liprin-beta-1 in transfizierten HEK293-Zellen.

Stabil mTRPC4 exprimierende HEK293-Zellen wurden mit Liprin-beta-1-IRES-GFP transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen geerntet, in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und verschiedene Mengen des erhaltenen Lysates in einem 8 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden entsprechende Mengen nicht transfizierter HEK293-Zellen aufgetragen. Zunächst wurde das Liprin-beta-1-Protein mit dem gekauften Antikörper 13961-1-AP detektiert (oben). Es ist im Lysat der transfizierten Zellen in deutlich größeren Mengen vorhanden als in dem der nicht-transfizierten Zellen. Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und diese mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper 236b inkubiert (unten). Die TRPC4-Expression scheint unbeeinflusst zu sein durch die gleichzeitige Expression von Liprin-beta-1.

dem Western Blotting wurde das Liprin-beta-1-Protein mit dem gekauften Antikörper 13961-1-AP (siehe Tabelle 2) detektiert. In Abbildung 24 (oben) ist in den transfizierten HEK mC4-Zellen ein deutliches Signal im Bereich von 110 kDa zu erkennen, das durch die Detektion von Liprin-beta-1 zustande kommt. In den nicht transfizierten HEK mC4-Zellen ist das Protein kaum nachweisbar, offensichtlich scheint es in dieser Zelllinie endogen nur in sehr geringen Mengen exprimiert zu werden. Dies könnte auch die massenspektrometrischen Ergebnisse erklären. Hier war Liprin-beta-1 als möglicher Interaktionspartner von TRPC4 nur in den Anreicherungen aus SBAC-Zellen identifiziert worden, nicht in denen aus HEK293-Zellen.

Um zu überprüfen, ob durch die Expression von Liprin-beta-1 die des TRPC4-Proteins in den HEK mC4-Zellen beeinflusst wird, wurden nachfolgend die Antikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt und durch Inkubation mit dem Antikörper 236b das TRPC4-Protein detektiert. Im unteren Teil von Abbildung 24 ist zu erkennen, dass TRPC4 in allen Proben nachweisbar ist. Durch Vergleich der Signalstärken in den Lysaten der transfizierten und der nicht-transfizierten Zellen wird deutlich, dass die TRPC4-Expression unbeeinflusst bleibt durch die gleichzeitigen Expression von Liprin-beta-1.

4.4.2 Klonierung der cDNS von Fryl von Maus in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP

Die cDNS des 340 kDa großen Fryl-Proteins von Maus weist eine Länge von 9021 bp auf. Das entsprechende DNS-Fragment konnte zwar mithilfe spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 5) mittels PCR aus einer Maushirn cDNS-Bibliothek amplifiziert werden, der Versuch es direkt in den 6100 bp großen pCAGGS-IRES-GFP-Vektor hineinzuklonieren scheiterte jedoch aufgrund der Größe des DNS-Fragmentes.

Zur Klonierung der cDNS wurde diese daher in drei etwa gleich große Fragmente unterteilt, die mittels PCR amplifiziert und anschließend nacheinander in den Vektor pBluescript SK- ligiert wurden. Abbildung 25 A zeigt eine schematische Darstellung der cDNS des mFryl-Proteins. Die drei eingezeichneten Fragmente wurden mit spezifischen Oligonukleotiden (3.1.7) amplifiziert, anschließend in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt (B) und nach Elektroelution und Ethanol-fällung in den EcoRV-geschnittenen Vektor pBluescript SK- hineinligiert (C, D, E). An das 5'-Ende von Fragment 1 und das 3'-Ende von Fragment 3 wurde die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Spe I (ACTAGT) kloniert. Am 5'-Ende von Fragment 1 wurde hinter diese zusätzlich die Kozak-Sequenz angehängt, um eine bessere Proteinexpression zu erzielen. Vor weiteren Klonierungsschritten wurden die drei so erhaltenen Plasmide (Abbildung 25, C, D, E) sequenziert, um sicherzustellen, dass das gewünschte DNS-Fragment inseriert wurde. Fragment 1 und Fragment 2 wurden nun mittels PCR aus den entsprechenden pBluescript-Vektoren (Abbildung 25 C, D) reamplifiziert und anschließend durch Elektroelution mit nachfolgender Ethanol-fällung aufgereinigt. Parallel dazu wurde der pBluescriptSK-, der Fragment 3 enthielt (Abbildung 26, A), mit den Enzymen Sma I und Mfe I geschnitten und danach dephosphoryliert (3.2.5.6.2), um eine Religation des Vektors auszuschließen. Das ebenfalls mit Mfe I behandelte Fragment 2 konnte nun gerichtet in diesen Vektor ligiert werden, sodass das in Abbildung 26 B gezeigte Plasmide entstand. Die zuvor verwendete Sma I-Schnittstelle wurde durch diesen Klonierungsschritt regeneriert. Der pBluscript-Vektor, der nun das Fragment 2 und 3 enthielt (Abbildung 26 B), wurde erneut mit Sma I hydrolysiert und das mittels PCR-amplifizierte Fragment 1 ungerichtet hineinligiert.

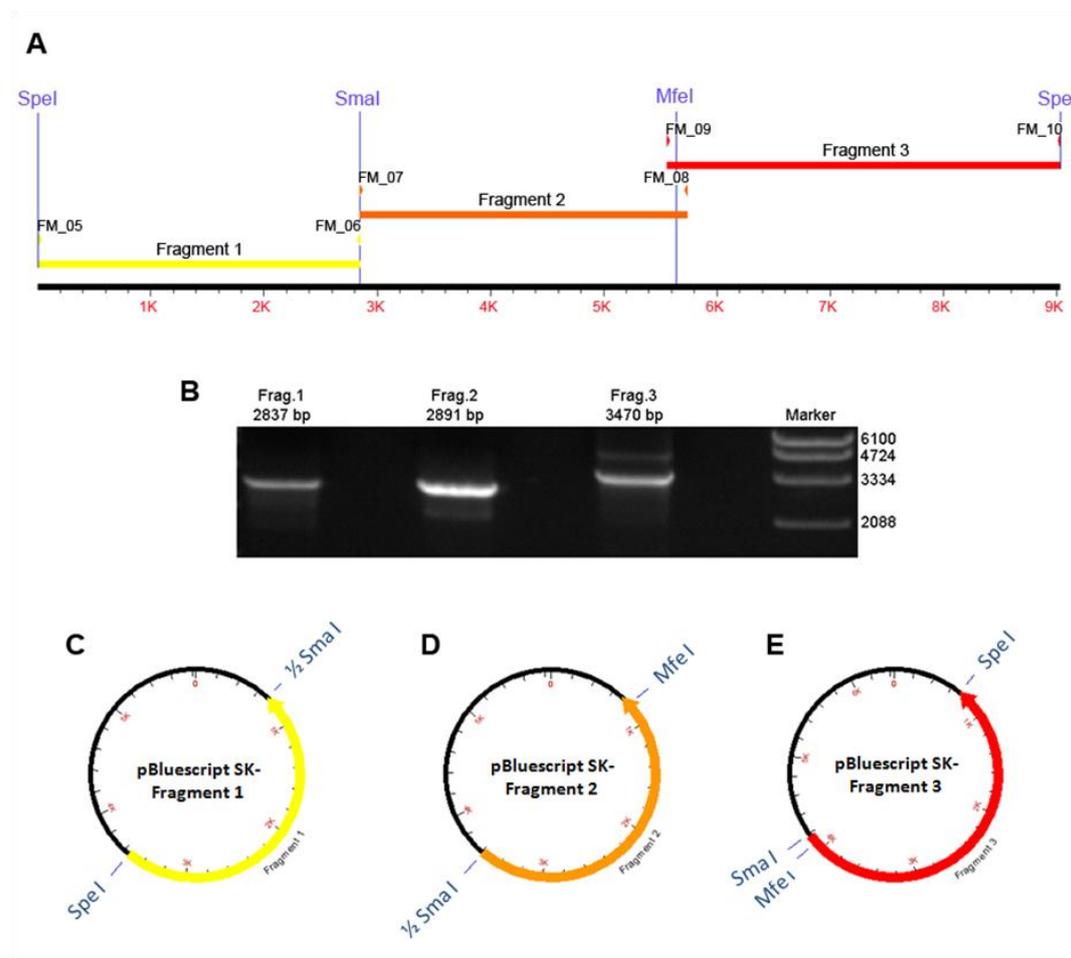


Abbildung 25: Amplifizierung der cDNS von mFryl in drei Fragmenten und Klonierung in den Vektor pBluescript SK-.

A zeigt die 9021bp große cDNS des mFryl-Proteins. Eingezeichnet sind die mittels PCR amplifizierten Fragmente und die dazu verwendeten Oligonukleotide. Für die weiteren Klonierungsschritte wichtige Restriktionsendonuklease-Schnittstellen sind blau dargestellt. Nach der PCR-Amplifizierung wurden die DNS-Fragmente in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt (B) und nach Elektroelution und Fällung in den Vektor pBluescript SK- ligiert (C, D, E).

Die gesamte cDNS des mFryl-Proteins befand sich nun in dem Klonierungsvektor pBluescript SK- (Abbildung 26, C). Zuletzt wurde durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym Spe I die gesamte mFryl-cDNS aus dem Plasmid herausgetrennt und in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP ligiert (Abbildung 26, D). Durch Sequenzierung wurde abschließend erneut die klonierte DNS überprüft.

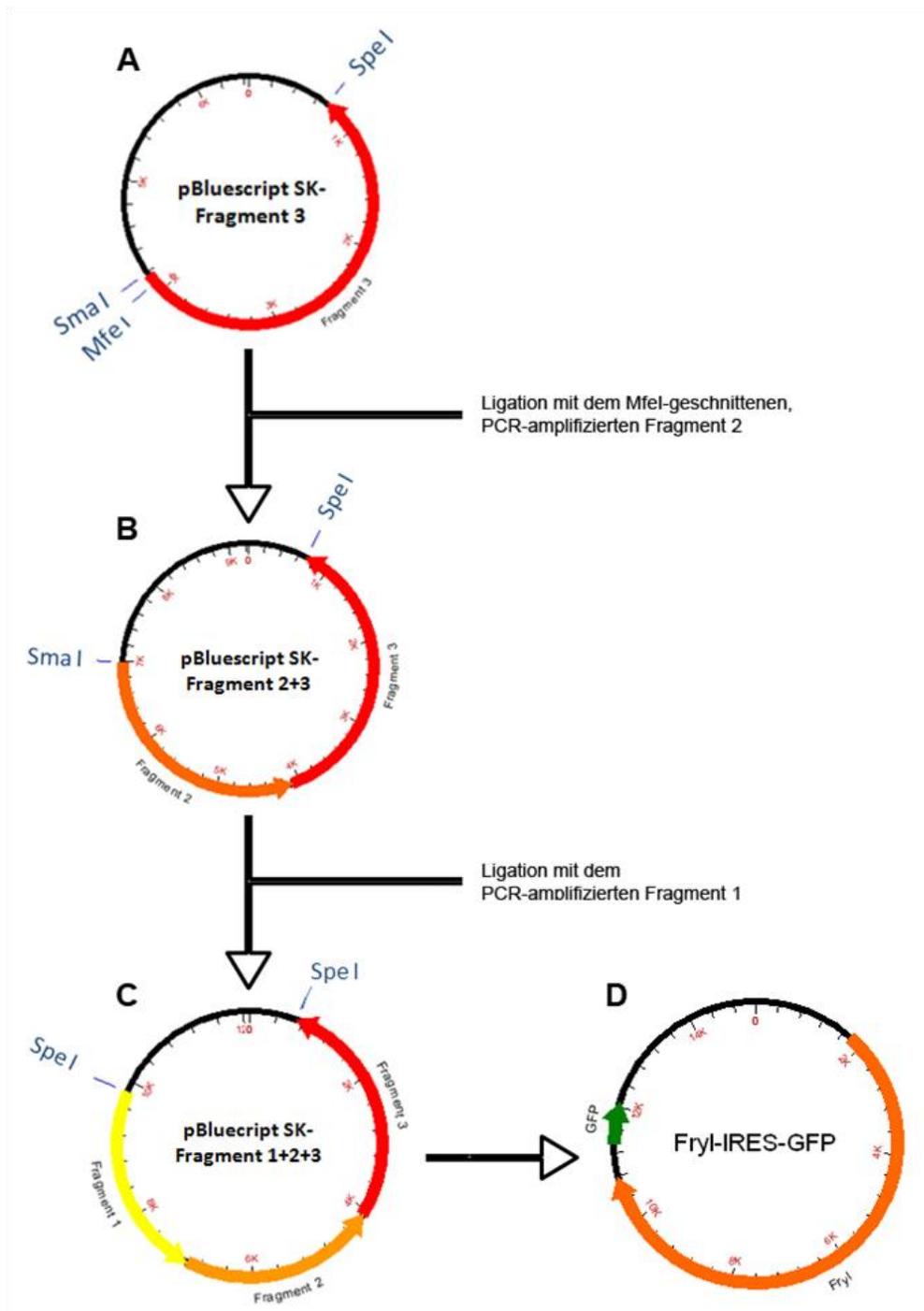


Abbildung 26: Klonierungsstrategie der cDNS von mFryl in den pBluescript SK- und Umklonierung in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP.

Der in (A) dargestellte pBluescript-Vektor, der Fragmente 3 enthält, wurde mit den Restriktionsenzymen Mfe I und Sma I geschnitten und anschließend das mittels PCR amplifizierte Fragment 2 hineinkloniert, sodass das in (B) gezeigte Plasmid entstand. Fragment 1 wurde nach Amplifizierung in dieses hineinkloniert. Der resultierende Vektor enthält nun die gesamte cDNS des mFryl-Proteins (C). Diese wurde durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease Spe I herausgetrennt und zuletzt in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP ligiert (D).

Abbildung 10 zeigt eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des Fryl-Proteins von Maus und Mensch. Beide stimmen in über 94 % der über 3000 Aminosäuren überein. Ein entsprechendes Protein von Rind ist bislang noch nicht nachgewiesen. Das durch Expression des generierten Vektors erhaltene Protein (Maus*) weist verglichen mit der Referenzsequenz der NCBI-Datenbank zwei Aminosäureaustausche auf (A zu V; G zu S).

Maus*	MSSITIDPDVKPGEYVIKSLFAEFAVQAEKKIEVVM AE PLEKLLSRSLQRGEDLQFDQLV	60
Maus	MSSITIDPDVKPGEYVIKSLFAEFAVQAEKKIEVVM AE PLEKLLSRSLQRGEDLQFDQLV	60
Mensch	MSNITIDPDVKPGEYVIKSLFAEFAVQAEKKIEVVM AE PLEKLLSRSLQRGEDLQFDQLI	60
	** .*****:	
Maus*	SSMSSVAEHCLPSLLRRTLFDWYRRQNGTDES YGYRPRSSTKSKGDEQHRERDYLLERRD	120
Maus	SSMSSVAEHCLPSLLRRTLFDWYRRQNGTDES YGYRPRSSTKSKGDEQHRERDYLLERRD	120
Mensch	SSMSSVAEHCLPSLLRRTLFDWYRRQNGTEDES YEYRPRSSTKSKGDEQQRERDYLLERRD	120
	*****.*****.*****:	
Maus*	LAVDFIFCLVLEVLKQIPVHPVPDPLVHEVLNLA FKHFKHKEGYSGTNTGNVHIIADLY	180
Maus	LAVDFIFCLVLEVLKQIPVHPVPDPLVHEVLNLA FKHFKHKEGYSGTNTGNVHIIADLY	180
Mensch	LAVDFIFCLVLEVLKQIPVHPVPDPLVHEVLNLA FKHFKHKEGYSGTNTGNVHIIADLY	180
	*****:	
Maus*	AEVIGVLAQSKFQAVRKKFVTELKELRQKEQSPHV VQSVISLIMGMKFFRVKMPVEDFE	240
Maus	AEVIGVLAQSKFQAVRKKFVTELKELRQKEQSPHV VQSVISLIMGMKFFRVKMPVEDFE	240
Mensch	AEVIGVLAQSKFQAVRKKFVTELKELRQKEQSPHV VQSVISLIMGMKFFRVKMPVEDFE	240
	*****:	
Maus*	ASFQFMQECAQYFLEVKDKDIKHALAGL FVEILIPVAAAVKNEVNVPCLNKFVEMLYQTT	300
Maus	ASFQFMQECAQYFLEVKDKDIKHALAGL FVEILIPVAAAVKNEVNVPCLNKFVEMLYQTT	300
Mensch	ASFQFMQECAQYFLEVKDKDIKHALAGL FVEILIPVAAAVKNEVNVPCLNKFVEMLYQTT	300
	*****:	
Maus*	FELSSRKKHSLALYPLITCLLCVSVQKQFFLN NWHIFLQNCLSHLKKNKDPKMSRVALES LY	360
Maus	FELSSRKKHSLALYPLITCLLCVSVQKQFFLN NWHIFLQNCLSHLKKNKDPKMSRVALES LY	360
Mensch	FELSSRKKHSLALYPLITCLLCVSVQKQFFLN NWHIFLQNCLSHLKKNKDPKMSRVALES LY	360
	*****:	
Maus*	RLWVYVIRIKCESNTVTQSR LMSIVSALFPKGSRSV VPRDTPLNIFVKIIQFIAQERLD	420
Maus	RLWVYVIRIKCESNTVTQSR LMSIVSALFPKGSRSV VPRDTPLNIFVKIIQFIAQERLD	420
Mensch	RLWVYVIRIKCESNTVTQSR LMSIVSALFPKGSRSV VPRDTPLNIFVKIIQFIAQERLD	420
	*****:	
Maus*	FAMKEIIFDLLSVGKSTKTFTINPERMNI GLRVFLVIADSLQKDGDPMPPTTG VILPSG	480
Maus	FAMKEIIFDLLSVGKSTKTFTINPERMNI GLRVFLVIADSLQKDGDPMPPTTG VILPSG	480
Mensch	FAMKEIIFDLLSVGKSTKTFTINPERMNI GLRVFLVIADSLQKDGEPMPPTTG VILPSG	480
	*****.*****:	
Maus*	NTLRVKKIFLNKTLTDEEAKVIGMSVYY PQVRKALDSILRHL DKEVGRPMCMTSVQMSNK	540
Maus	NTLRVKKIFLNKTLTDEEAKVIGMSVYY PQVRKALDSILRHL DKEVGRPMCMTSVQMSNK	540
Mensch	NTLRVKKIFLNKTLTDEEAKVIGMSVYY PQVRKALDSILRHL DKEVGRPMCMTSVQMSNK	540
	*****:	
Maus*	EPEDMITGERKPKIDLFRTCIAAI PRLIPDGMSR TD LIE LLARLTIHMDEELRALAFNTL	600
Maus	EPEDMITGERKPKIDLFRTCIAAI PRLIPDGMSR TD LIE LLARLTIHMDEELRALAFNTL	600
Mensch	EPEDMITGERKPKIDLFRTCIAAI PRLIPDGMSR TD LIE LLARLTIHMDEELRALAFNTL	600
	*****:	
Maus*	QALMLDFPDWREDVLSGFVYFIVRE VTDVHPTLLDNAVKMLVQLINQWKQAAQM YNRTQD	660
Maus	QALMLDFPDWREDVLSGFVYFIVRE VTDVHPTLLDNAVKMLVQLINQWKQAAQM YNRTQD	660
Mensch	QALMLDFPDWREDVLSGFVYFIVRE VTDVHPTLLDNAVKMLVQLINQWKQAAQM HNKNDQD	660
	*****.*****.*****:	
Maus*	SQHGIANGGPHPPPLERNPYS TVFHVVEGFALVILCSSRPATRRLAVSVLREIRALFALL	720
Maus	SQHGIANGGPHPPPLERNPYS TVFHVVEGFALVILCSSRPATRRLAVSVLREIRALFALL	720
Mensch	TQHGVANGASHPPPLERS PYSNVFHVVEGFALVILCSSRPATRRLAVSVLREIRALFALL	720
	*****.*****.*****:	

Maus*	EVPKGDDELAIDVMDRLSPSILESFIHLTGADQTTLLYCPSSVDLQTLADWNSSPISHQF	780
Maus	EVPKGDDELAIDVMDRLSPSILESFIHLTGADQTTLLYCPSSVDLQTLADWNSSPISHQF	780
Mensch	EIPKGDDELAIDVMDRLSPSILESFIHLTGADQTTLLYCPSSIDLQTLAEWNSSPISHQF *.*****.*****.*****	780
Maus*	DVISPSHIWIFAHVTQGQDPWIISLSSFLKQENLPKHCSTAVSYAWMFAYTRLQLLSPQV	840
Maus	DVISPSHIWIFAHVTQGQDPWIISLSSFLKQENLPKHCSTAVSYAWMFAYTRLQLLSPQV	840
Mensch	DVISPSHIWIFAHVTQGQDPWIISLSSFLKQENLPKHCSTAVSYAWMFAYTRLQLLSPQV *****	840
Maus*	DINSPINAKKVNATTSSDSYIGLWRNYLVLCCSAATSPSPSAPAGSVRCSPPETLASTPD	900
Maus	DINSPINAKKVNATTSSDSYIGLWRNYLVLCCSAATSPSPSAPAGSVRCSPPETLASTPD	900
Mensch	DINSPINAKKVNATTSSDSYIGLWRNYLVLCCSAATS-SSSTSAGSVRCSPPETLASTPD *****.*****.***** *.*.*****	899
Maus*	SGYSIDSKIVGIPSPSSLFKHIVPMRSESMEITESLVLGLGRTPGAFRELIEELHPII	960
Maus	SGYSIDSKIVGIPSPSSLFKHIVPMRSESMEITESLVLGLGRTPGAFRELIEELHPII	960
Mensch	SGYSIDSKIIIGIPSPSSLFKHIVPMRSESMEITESLVLGLGRTPGAFRELIEELHPII *****.*****.*****	959
Maus*	KEALERRPENMKRRRRRDILRVQLVRIPELLADAGVISHSASGGLDSETHFLNNTLLEYV	1020
Maus	KEALERRPENMKRRRRRDILRVQLVRIPELLADAGVISHSASGGLDSETHFLNNTLLEYV	1020
Mensch	KEALERRPENMKRRRRRDILRVQLVRIPELLADAGVISHSASGGLDNE'THFLNNTLLEYV *****.*****	1019
Maus*	DLTRQLEAENEKSDTLKDIRCHFSALVANIIONVPVHQRRSIFPQQSLRHSFLMFLFSH	1080
Maus	DLTRQLEAENEKSDTLKDIRCHFSALVANIIONVPVHQRRSIFPQQSLRHSFLMFLFSH	1080
Mensch	DLTRQLEAENEKSDTLKDIRCHFSALVANIIONVPVHQRRSIFPQQSLRHSFLMFLFSH *****	1079
Maus*	WAGPFSIMFTPLDRYSDRNMQINRHQYCALKAMSAVLCCGPVADNVGLSSDGLYKWLND	1140
Maus	WAGPFSIMFTPLDRYSDRNMQINRHQYCALKAMSAVLCCGPVADNVGLSSDGLYKWLND	1140
Mensch	WAGPFSIMFTPLDRYSDRNMQINRHQYCALKAMSAVLCCGPVADNVGLSSDGLYKWLND *****	1139
Maus*	ILDSLDDKVVHQLGCEAVTLLLELNPQSSLMYWAVDRCYTGSRRVAAGCFKAIANVFQNR	1200
Maus	ILDSLDDKVVHQLGCEAVTLLLELNPQSSLMYWAVDRCYTGSRRVAAGCFKAIANVFQNR	1200
Mensch	ILDSLDDKVVHQLGCEAVTLLLELNPQSSLMYWAVDRCYTGSRRVAAGCFKAIANVFQNR *****.*****.*****	1199
Maus*	DYQCDTVMLLNLILFKAADSSRSIYEVAMQLLQILEPKMFRYAHKLEVQRTDGVLSQLSP	1260
Maus	DYQCDTVMLLNLILFKAADSSRSIYEVAMQLLQILEPKMFRYAHKLEVQRTDGVLSQLSP	1260
Mensch	DYQCDTVMLLNLILFKAADSSRSIYEVAMQLLQILEPKMFRYAHKLEVQRTDGVLSQLSP *****	1259
Maus*	LPHLYSVSYYQLSEELARAYPELTLAIFSEISQRIQTAHPAGRQAMLHYLLPMMNIELV	1320
Maus	LPHLYSVSYYQLSEELARAYPELTLAIFSEISQRIQTAHPAGRQAMLHYLLPMMNIELV	1320
Mensch	LPHLYSVSYYQLSEELARAYPELTLAIFSEISQRIQTAHPAGRQVLMHYLLPMMNIELV *****.*****	1319
Maus*	DLKPLPSGRRQDEDEDDSLKDRELMVTSRRWLRGEGWGWSPQATAMVLNNLMYMTAKYGDE	1380
Maus	DLKPLPSGRRQDEDEDDSLKDRELMVTSRRWLRGEGWGWSPQATAMVLNNLMYMTAKYGDE	1380
Mensch	DLKPLPTARRHDEDEDDSLKDRELMVTSRRWLRGEGWGWSPQATAMVLNNLMYMTAKYGDE *****.*.*.*****	1379
Maus*	LAWSEVENVWTTLADGWPKNLKIIHLFLSICGVNSEPSLLPYVKKVIVYLGRDKTMQLL	1440
Maus	LAWSEVENVWTTLADGWPKNLKIIHLFLSICGVNSEPSLLPYVKKVIVYLGRDKTMQLL	1440
Mensch	LAWSEVENVWTTLADGWPKNLKIIHLFLSICGVNSEPSLLPYVKKVIVYLGRDKTMQLL *****	1439
Maus*	EELVSELQLTDPVSSGVTHMDNPPYYRITSSCKIPSVTSGTSSSNTMVAPTDGNPDSKV	1500
Maus	EELVSELQLTDPVSSGVTHMDNPPYYRITSSCKIPSVTSGTSSSNTMVAPTDGNPDSKA	1500
Mensch	EELVSELQLTDPVSSGVTHMDNPPYYRITSSYKIPSVTSGTSSSNTMVAPTDGNPDKP *****.*****.*.	1499
Maus*	LKENFEESYVHLDIYGLNSHLNRQHHRLESRYSSSSGGSYEEEEKSDSMPLYSNWRCLKVM	1560
Maus	LKENFEESYVHLDIYGLNSHLNRQHHRLESRYSSSSGGSYEEEEKSDSMPLYSNWRCLKVM	1560
Mensch	IKENIEESYVHLDIYGLNSHLNRQHHRLESRYSSSSGGSYEEEEKSDSMPLYSNWRCLKVM :***.*****.*****	1559

Maus*	EHNQGEPLFPFPAGGCWSPLVDYVPETASPLPLHRCNIAVILLTDLIIDHSVKVEWGSY	1620
Maus	EHNQGEPLFPFPAGGCWSPLVDYVPETASPLPLHRCNIAVILLTDLIIDHSVKVEWGSY	1620
Mensch	EHNQGEPLFPFPAGGCWSPLVDYVPETSSPGLPLHRCNIAVILLTDLIIDHSVKVEWGSY *****:*****	1619
Maus*	LHLLLHAIFIGFDHCHPEVYEHCKRLLLHLLIVMGPNSDIRTVASVLLRDKEFNEPRVLT	1680
Maus	LHLLLHAIFIGFDHCHPEVYEHCKRLLLHLLIVMGPNSDIRTVASVLLRDKEFNEPRVLT	1680
Mensch	LHLLLHAIFIGFDHCHPEVYEHCKRLLLHLLIVMGPNSNIRTVASVLLRNKEFNEPRVLT *****:*****:*****	1679
Maus*	VKQTAHSDYFTFTAGINDFTPDYQPSPMTDSGLSSSTSSSISLGNNNSAAISHLHTTLLGE	1740
Maus	VKQTAHSDYFTFTAGINDFTPDYQPSPMTDSGLSSSTSSSISLGNNNSAAISHLHTTLLGE	1740
Mensch	VKQVAHLDYNFTAGINDFIPDYQPSPMTDSGLSSSTSSSISLGNNNSAAISHLHTTLLNE ***.*.*.******:*****:***	1739
Maus*	VDLSVEQDGKVKTLMEFITSRKRGPLWNHEDVSSKNPSIKSADQLATFLKHVVSVFKQSN	1800
Maus	VDLSVEQDGKVKTLMEFITSRKRGPLWNHEDVSSKNPSIKSADQLATFLKHVVSVFKQSN	1800
Mensch	VDLSVEQDGKVKTLMEFITSRKRGPLWNHEDVSAKNPSIKSAEQLTTFLLKHVVSVFKQSS **.******:*****:***:*****	1799
Maus*	AEGIHLEHLSEVALQTALSCSSRHYAGRSFQIFRALKQPLSADTLDVLSRLVETVGD	1860
Maus	AEGIHLEHLSEVALQTALSCSSRHYAGRSFQIFRALKQPLSADTLDVLSRLVETVGD	1860
Mensch	SEGIHLEHLSEVALQTALSCSSRHYAGRSFQIFRALKQPLTATLDVLSRLVETVGD :*****:*****:*****:*****	1859
Maus*	GEDAQGFVIELLLTLESAIDTLAETMKHYDLLSALSQSSYHDPVMGNKYAANRSTGQLN	1920
Maus	GEDAQGFVIELLLTLESAIDTLAETMKHYDLLSALSQSSYHDPVMGNKYAANRSTGQLN	1920
Mensch	GEDAQGFVIELLLTLESAIDTLAETMKHYDLLSALSQTSYHDPIMGNKYAANRSTGQLN *****:*****:*****:*****	1919
Maus*	LSTSPINSSGHLGCGDTRSNSLRSLVGDRRGDRRSNTLDITDGRINHSGSLARTRSL	1980
Maus	LSTSPINSSGHLGCGDTRSNSLRSLVGDRRGDRRSNTLDITDGRINHGGSLARTRSL	1980
Mensch	LSTSPINSSYLGYNNSNARSNSLRSLVGDRRGDRRSNTLDIMDGRINHSSSLARTRSL *****:***.*.*:*****:*****:*****:*****:*****	1979
Maus*	SSLREKGVYDTQPPEPSNLMATIFWIATSLLESDEYIEYLLALRLLSKLLTHLPLDKSE	2040
Maus	SSLREKGVYDTQPPEPSNLMATIFWIATSLLESDEYIEYLLALRLLSKLLTHLPLDKSE	2040
Mensch	SSLREKGMVDVQSTTEPTNLMATIFWIAASLLESDEYIEYLLALRLLNKLIIHLPLDKSE *****:***.*.*:*****:*****:*****:*****:***	2039
Maus*	SREKIENVQSKLKWNSFPGLQQLFLKGFTSVSTQEMTVHLLSQLISVSKHTLVDPQSQVSG	2100
Maus	SREKIENVQSKLKWNSFPGLQQLFLKGFTSVSTQEMTVHLLSQLISVSKHTLVDPQSQVSG	2100
Mensch	SREKIENVQSKLKWTFNFPGLQQLFLKGFTSASTQEMTVHLLSKLISVSKHTLVDPQSQVSG *****:*****:*****:*****:*****:*****:***	2099
Maus*	FPLNILCLLPHLIQHFDSPQFCKETASRIAKVCAEEKCPTLVNLAHMMSLYSTHTYSRD	2160
Maus	FPLNILCLLPHLIQHFDSPQFCKETASRIAKVCAEEKCPTLVNLAHMMSLYSTHTYSRD	2160
Mensch	FPLNILCLLPHLIQHFDSPQFCKETASRIAKVCAEEKCPTLVNLAHMMSLYSTHTYSRD *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	2159
Maus*	CSNWINVVCRYLHDSFSEATFSLVTYLAELLEKGLSSMQQSLQIIYSLLSHIDLAAAPV	2220
Maus	CSNWINVVCRYLHDSFSEATFSLVTYLAELLEKGLSSMQQSLQIIYSLLSHIDLAAAPV	2220
Mensch	CSNWINVVCRYLHDSFSDTTFNLVTYLAELLEKGLSSMQQSLQIIYSLLSHIDLAAAPA *****:***.*.*:*****:*****:*****:*****:*****	2219
Maus*	KQFNLEIIKIIIGKYVQSPYWEALNIIKLVVSRASLVVPNDIPKAYGVDVGSPEISFAK	2280
Maus	KQFNLEIIKIIIGKYVQSPYWEALNIIKLVVSRASLVVPNDIPKAYGVDVGSPEISFAK	2280
Mensch	KQFNLEIIKIIIGKYVQSPYWEALNIIKLVVSRASLVVPSDIPKTYGGDTGSPEISFTK *****:*****:***.*.*:*****:***	2279
Maus*	IFNNVSKELPGKTLDFHFDISETPIIGNKYGGQHSAAGRNGKAKVIAVTRSTSSTSSGST	2340
Maus	IFNNVSKELPGKTLDFHFDISETPIIGNKYGGQHSAAGRNGKAKVIAVTRSTSSTSSGST	2340
Mensch	IFNNVSKELPGKTLDFHFDISETPIIGNKYGDQHSAAGRNGKPKVIAVTRSTSSTSSGSN *****:*****:*****:*****:*****:*****	2339
Maus*	SNALVPVSWKRPQLSQRRTREKLMNVLSLCGPESGLPKNPSVVFSSNEDLEVGDQQTSLI	2400
Maus	SNALVPVSWKRPQLSQRRTREKLMNVLSLCGPESGLPKNPSVVFSSNEDLEVGDQQTSLI	2400
Mensch	SNALVPVSWKRPQLSQRRTREKLMNVLSLCGPESGLPKNPSVVFSSNEDLEVGDQQTSLI *****:*****:*****:*****:*****:*****	2399

Maus*	STTEDI IQEEVAVEDNSSEQQFGVFKDFDFLDVELEDAEGESMDNFWGVRRLSLSID	2460
Maus	STTEDI IQEEVAVEDNSSEQQFGVFKDFDFLDVELEDAEGESMDNFWGVRRLSLSID	2460
Mensch	STTEDINQEEVAVEDNSSEQQFGVFKDFDFLDVELEDAEGESMDNFWGVRRLSLSID *****	2459
Maus*	KGDTPSLQEQYPCSSSTPSLTLTNQEDTDESSEEEAALASQILSRTOMLNSDCVTEDMMP	2520
Maus	KGDTPSLQEQYPCSSSTPSLTLTNQEDTDESSEEEAALASQILSRTOMLNSDCVTEDMMP	2520
Mensch	KGDTPSLQEQYQCSSSTPSLNLTNQEDTDESSEEEAALASQILSRTOMLNSDSATDETIIP ***** .***** .***** .: .: .: *	2519
Maus*	EHQDLLQ-SQDSASSNTTEDVLQIRDTPSLEACLDNASSQLPEGTSSVLKEEHVTAFFED	2579
Maus	EHQDLLQ-SQDSASSNTTEDVLQIRDTPSLEACLDNASSQLPEGTSSVLKEEHVTAFFED	2579
Mensch	DHPDLLLQSEDSTGSIITTEEVLQIRDTPLEASLDNANSRLPEDTTSVLKEEHVTFED :* *** .:***. * ***.*****.***.***.***.***.***.***.***.***	2579
Maus*	EGSYVIPDQQDPLVCRGILDLEETDMPEPLAPESYPESICEEDVTLALKELDERCEEEEA	2639
Maus	EGSYVIPDQQDPLVCRGILDLEETDMPEPLAPESYPESICEEDVTLALKELDERCEEEEA	2639
Mensch	EGSYIIQEQQESLVCQGILDLEETEMPEPLAPESYPESVCEEDVTLALKELDERCEEEEA *****. * :*. .***.*****.*****.*****.*****.*****	2639
Maus*	DFSGLSQEEDEQDGFPEVQTSPLPTPFLSAIIAAFQPMAYEDEEEAWRCHVNQTLSDTD	2699
Maus	DFSGLSQEEDEQDGFPEVQTSPLPTPFLSAIIAAFQPMAYEDEEEAWRCHVNQTLSDTD	2699
Mensch	DFSGLSQDEEEQDGFPEVQTSPLPSPFLSAIIAAFQPVAYDDEEEAWRCHVNQMLSDTD *****. :*.*****.*****.*****.***.***** *****	2699
Maus*	GSCAVFTFHVFSRFLFQTIQRKFGEITKEAVGFLGESLQRIGTKFKSSLEVMMACSECPTV	2759
Maus	GSCAVFTFHVFSRFLFQTIQRKFGEITKEAVGFLGESLQRIGTKFKSSLEVMMACSECPTV	2759
Mensch	GSCAVFTFHVFSRFLFQTIQRKFGEITNEAVSFLGDSLQRIGTKFKSSLEVMLCSECPTV ** .*****.*****.***.***.***** *****	2759
Maus*	FVDAETLMACGLLETLKFGVLELQEHLDYTTKREAAEQWLDNCKRTFGANEDIYRMNTN	2819
Maus	FVDAETLMACGLLETLKFGVLELQEHLDYTTKREAAEQWLDNCKRTFGANEDIYRMNTN	2819
Mensch	FVDAETLMSCGLLETLKFGVLELQEHLDYTNVKREAAEQWLDNCKRTFGAKEDMYRINTD *****.*****.*****.*****.*****.***.***.***.***	2819
Maus*	AH-----ELELCRRLYRLHFQLLLLFQAYCKLINQVNTIKNEAEVINMSEELAQLLEGIL	2873
Maus	AH-----ELELCRRLYRLHFQLLLLFQAYCKLINQVNTIKNEAEVINMSEELAQLLEGIL	2873
Mensch	AQQMEILAELELCRRLYKLFHQLLLLLFQAYCKLINQVNTIKNEAEVINMSEELAQLSIL * : *****.*****.*****.*****.*****.***	2879
Maus*	KEAEAASENEEIDISKAAQTTIETAIHSLIETLKNKEFVSAVAQVKAFTLWPNDFGSC	2933
Maus	KEAEAASENEEIDISKAAQTTIETAIHSLIETLKNKEFVSAVAQVKAFTLWPNDFGSC	2933
Mensch	KEAESASENEEIDISKAAQTTIETAIHSLIETLKNKEFISAVAQVKAFTSLWPNDFGSC ****.*****.*****.*****.*****.***.*****	2939
Maus*	DDDPVQTLHLHIYFHHQTLGQTGSFAVISSNLDMSEANCKLMELNLEIRESLRTVQSYPLL	2993
Maus	DDDPVQTLHLHIYFHHQTLGQTGSFAVISSNLDMSEANCKLMELNLEIRESLRTVQSYPLL	2993
Mensch	EDDPVQTLHLHIYFHHQTLGQTGSFAVIGSNLDMSEANYKLMELNLEIRESLRMVQSYQLL :*****.*****.***** ***** **	2999
Maus*	AQTKPVGNTSTGF 3007	
Maus	AQTKPVGNTSTGF 3007	
Mensch	AQAKPMGNMSTGF 3013 ** :*.***.***.***	

Abbildung 27: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz des Fryl-Protein von Maus und Mensch sowie der klonierten Sequenz.

Mit ClustalW2 erstellte Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des Fryl-Proteins von Maus und Mensch sowie der Aminosäuresequenz des durch Expression des Vektors Fryl-IRES-GFP erhaltenen Proteins. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*), konservierte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt (:), und semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt (.) gekennzeichnet. Ein Aminosäureaustausch ist durch ein Leerzeichen markiert. Rot markiert sind die beiden Aminosäuren des generierten Proteins, die sich von der Referenzsequenz der NCBI-Datenbank unterscheiden. Die zugrunde liegenden Sequenzen entsprechen den UniProt-Einträgen F8VQ05 (F8VQ05_Maus) und O94915 (FRYL_Mensch).

4.4.2.1 Überprüfung der Expression des mFryl-Proteins in transfizierten HEK293-Zellen mittels Western Blotting

Das Plasmid Fryl-IRES-GFP, das aus den in 4.4.2 beschriebenen Klonierungsschritten resultierte, weist einschließlich des Vektors eine Größe von mehr als 15 kpb auf. Daher war es notwendig zu überprüfen, ob der Vektor bei Zelltransfektionen aufgenommen und das Fryl-Protein in ausreichendem Maße exprimiert wird.

Ein Kulturschälchen stabil mTRPC4 exprimierender HEK293-Zellen (HEK mC4-Zellen) wurde dazu 48 Std. nach Transfektion mit dem Konstrukt Fryl-IRES-GFP geerntet und in 150 μ l 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung wurden die enthaltenen Proteine denaturiert (20 Min. bei 61 °C) und verschiedene Mengen der erhaltenen Lysate in einem 7 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden entsprechende Mengen eines Zelllysates nicht transfizierter HEK mC4-Zellen im Gel mitaufgetragen.

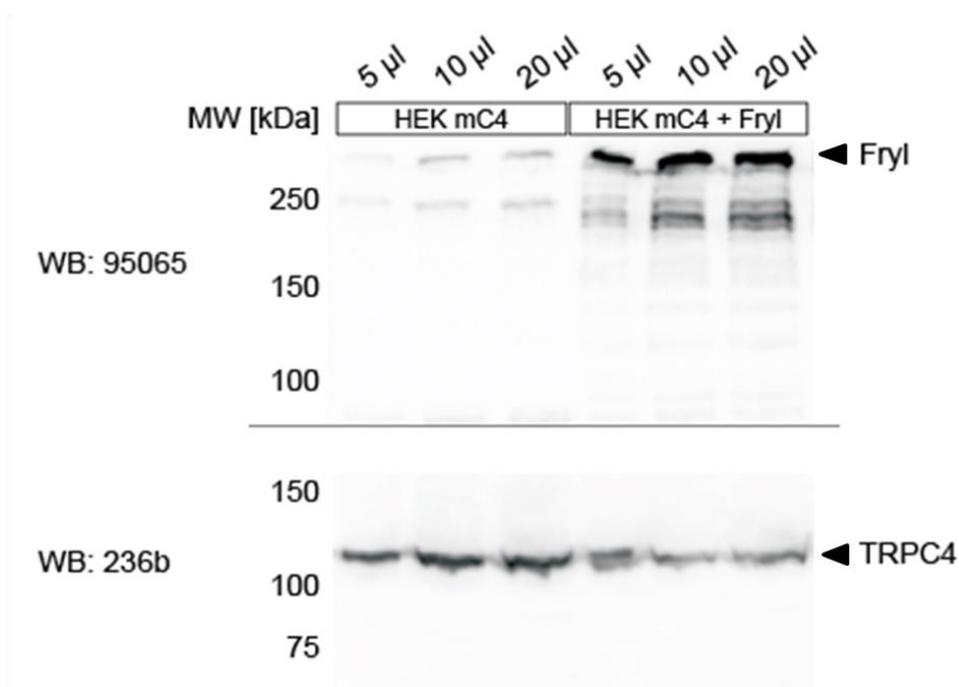


Abbildung 28: Überprüfung der Expression des mFryl-Proteins in transfizierten HEK293-Zellen.

48 Std. nach der Transfektion mit dem Plasmid Fryl-IRES-GFP wurden HEK mC4-Zellen geerntet, in 150 μ l 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und nach dem Denaturieren unterschiedliche Mengen in einem 7 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden entsprechende Mengen nicht transfizierter HEK293-Zellen parallel aufgetragen. In nicht transfizierten HEK mC4-Zellen kann Fryl mithilfe des gekauften Antikörpers 95065 bereits schwach detektiert werden, ist aber in den transfizierten Zellen in deutlich stärkerem Maße exprimiert (oben). Von der Membran wurden anschließend die Antikörper abgelöst und diese mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper 236b inkubiert (unten). Zu sehen ist, dass das TRPC4-Protein in den Zelllysaten der transfizierten und der nicht-transfizierten Zellen in etwa gleichen Mengen vorhanden ist. Seine Expression wird also durch die Transfektion mit Fryl-IRES-GFP nicht beeinflusst.

Abbildung 28 oben zeigt den Western Blot, in dem zunächst das Fryl-Protein mithilfe des gekauften Antikörpers 95065 detektiert wurde. Zu sehen ist, dass bereits nicht transfizierte HEK mC4-Zellen das Protein endogen exprimieren. Es kann als schwache Bande im Bereich von etwa 340 kDa im Western Blot nachgewiesen werden. Im Zelllysat der mit Fryl-IRES-GFP transfizierten Zellen sind jedoch deutlich stärkere Signale zu erkennen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das entsprechende Plasmid von den HEK mC4-Zellen aufgenommen und das 340 kDa große Fryl-Protein gebildet wurde. Im Bereich von 250 bis 200 kDa sind im Lysat der transfizierten Zellen weitere Banden zu erkennen. Diese stellen möglicherweise Degradationsprodukte des Fryl-Proteins dar, die durch den Verdau mit endogen in den Zellen vorhandenen Proteasen entstehen. Diese können während des Zellaufschlusses freigesetzt werden. Nach Detektion des Fryl-Proteins sollte anschließend untersucht werden, ob durch dessen Überexpression in den transfizierten Zellen die Bildung des TRPC4-Proteins beeinflusst wird. Dazu wurden gebundene Antikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt und diese mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper 236b inkubiert (Abbildung 28, unten). Die so im Western Blot detektierten Signale weisen in transfizierten und in nicht-transfizierten HEK mC4-Zellen etwa gleiche Stärken auf. Die TRPC4-Expression scheint daher durch die Transfektion mit Fryl-IRES-GFP nicht beeinflusst zu werden.

4.5 Bestätigung und weitere Charakterisierung der Proteininteraktion zwischen TRPC4 und Fryl

4.5.1 Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Fryl aus transfizierten HEK293-Zellen

In 4.3.2 konnte bereits in HEK bTRPC4 Zellen, welche Fryl endogen exprimieren, mittels Ko-Immunpräzipitation die Interaktion zwischen dem TRPC4- und dem Fryl-Protein bestätigt werden. Im Folgenden sollte in einem weiteren unabhängigen Experiment diese Proteininteraktion belegt werden. Dazu wurden HEK293-Zellen, welche das mTRPC4-Protein stabil exprimieren (HEK mC4 Zellen) mit der cDNS des mFryl-Proteins transfiziert und aus den erhaltenen Zelllysaten Ko-Immunpräzipitationen angefertigt.

Für diesen Versuch wurden drei Kulturschälchen HEK mC4 Zellen mit dem Konstrukt Fryl-IRES-GFP transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen geerntet und in 2 ml Solubilisierungspuffer, der 1 % Digitonin als Detergens enthielt, aufgenommen. Der erhaltene

Proteinextrakt (3.2.2.8.2) wurde auf drei Ansätze verteilt und diese mit den Antikörpern bCCE1, anti-Fryl (A302-644A) und unspezifischen Kaninchen-Antikörpern (rbIgGs), welche zuvor nicht-kovalent an magnetischen Protein A Beads gekoppelt worden waren (3.2.2.8.4), inkubiert. Nach Elution der Proteine wurden jeweils gleiche Mengen in die Taschen eines NuPAGE Gels (4-12 %, Invitrogen) eingebracht und elektrophoretisch getrennt. Im darauf folgenden Western Blot wurde zunächst das TRPC4-Protein mit dem Antikörper 236b detektiert. Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und diese mit dem Fryl-spezifischen Antikörper 95065 inkubiert. In Abbildung 29 (oben) ist zu sehen, dass das mTRPC4-Protein mit dem Antikörper bCCE1 spezifisch angereichert werden konnte. Ein entsprechendes Signal im Bereich von 100 kDa ist sowohl im Zelllysate (IP -) als auch im Eluat der Immunpräzipitation (bCCE1) nachweisbar. Durch die Anreicherung des Fryl-Proteins mit dem Antikörper A302-644A wird das TRPC4-Protein jedoch nicht mitangereichert.

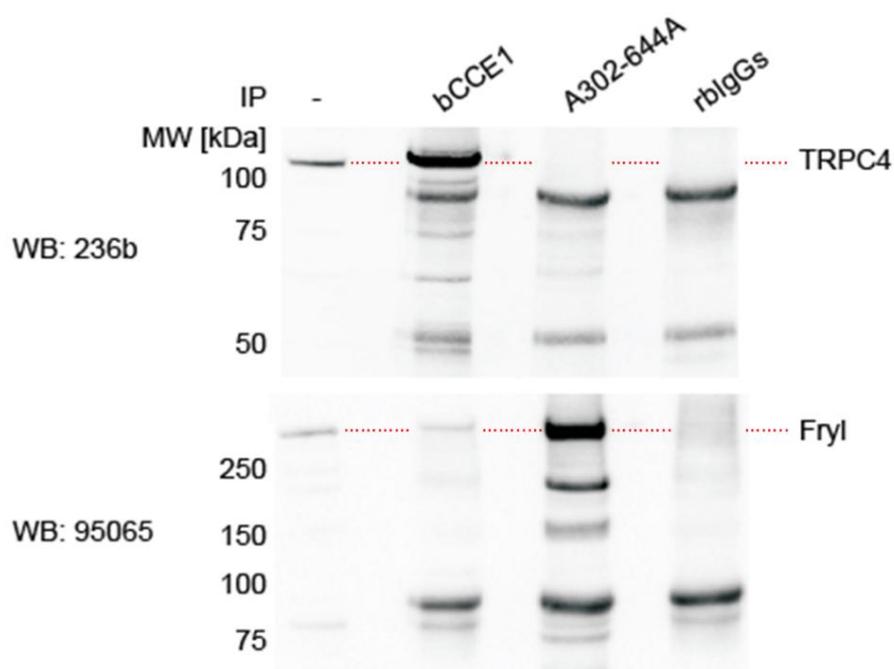


Abbildung 29: Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Fryl aus HEK mC4 Zellen, die mit Fryl-IRES-GFP transfiziert wurden (IP6).

Zu sehen sind Anreicherungen mit den Antikörpern bCCE1, A302-644A (anti-Fryl) und Kaninchen-Immunglobulinen (rbIgGs) aus dem Zelllysate von HEK mC4 Zellen, die mit dem Konstrukt Fryl-IRES-GFP transfiziert wurden. Als Kontrolle wurde ein Teil des eingesetzten Zelllysates mitaufgetragen ("IP -"). Zunächst wurde das TRPC4-Protein detektiert (oben), anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und das Fryl-Protein nachgewiesen (unten).

Auch das Fryl-Protein kann im Zelllysate detektiert werden und mit dem Antikörper A302-644A angereichert werden, was im unteren Teil von Abbildung 29 zu erkennen ist. Zudem ist es aber auch im Eluat der Immunpräzipitation mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper bCCE1 vorhanden. Da ein entsprechendes Signal in der unspezifischen Kontroll-Anreicherung fehlt, kann davon ausgegangen werden, dass Fryl im Zelllysate im Komplex mit TRPC4 vorliegt und daher mit diesem angereichert wird. Mit diesem Versuch konnte also auch für das TRPC4-Protein von Maus eine Interaktion mit dem Fryl-Protein nachgewiesen werden.

4.5.2 Lokalisierung der TRPC4-Fryl-Interaktion mithilfe von GST-Pulldown-Versuchen

4.5.2.1 Überprüfung der Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung

Verschiedene cDNS-Bereiche des TRPC4-Proteins waren wie in 3.2.4.1 beschrieben in den Vektor pGEX-4T-2 kloniert worden, der es ermöglicht Fusionsproteine zu exprimieren, die aus dem jeweiligen Protein und einer N-terminal dazu angehängten Glutathion-S-Transferase (GST) bestehen. Über diese ist es in nachfolgenden Schritten möglich die Fusionsproteine mithilfe von Agarose, an die Glutathion, das Substrat der Glutathion-S-Transferase, kovalent gekoppelt ist, aus bakteriellen Lysaten aufzureinigen. Anschließend können die immobilisierten TRPC4-GST-Fusionsproteine mit Zelllysaten inkubiert werden, wobei weitere Proteine, die mit dem entsprechenden Bereich des TRPC4-Proteins interagieren, angereichert werden. Der GST-Pulldown kann so zum einen dazu genutzt werden mit anderen Methoden identifizierte Proteininteraktionen zu bestätigen, zum anderen kann der Bereich, in dem die Proteinwechselwirkung stattfindet, näher lokalisiert werden.

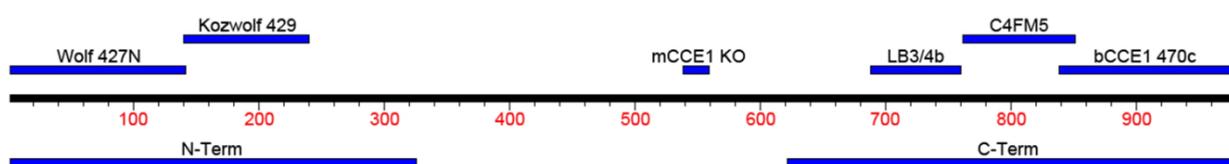


Abbildung 30: Übersicht über die eingesetzten GST-TRPC4-Fusionsproteine.

Zu sehen ist eine schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des TRPC4-Proteins. Die blauen Balken markieren die Lage der verschiedenen GST-TRPC4-Fusionsproteine. Wolf 427N und Kozwolf 429 sind am N-Terminus, LB3/4b, C4FM5 und bCCE1 am C-Terminus des TRPC4-Proteins lokalisiert. Das Fusionsprotein mCCE1 KO stellt einen Bereich zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 des TRPC4-Proteins dar.

In Abbildung 30 ist die Lage der verschiedenen exprimierten GST-TRPC4-Fusionsproteine in Bezug auf das gesamte TRPC4-Protein dargestellt. Nachdem die Fusionsproteine in dem *E.coli*-Stamm BL21 exprimiert und aus dem erhaltenen Bakterienlysat aufgereinigt worden waren (3.2.4.2), wurden verschiedene Mengen (5 μ l bzw. 10 μ l) in einem 12 %-igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend die Proteine mittels Coomassie-Färbung (3.2.2.7.1) im Gel sichtbar gemacht. Eine Probe des Zelllysates vor (+) und nach (-) Inkubation mit der GST-Agarose wurde zur Kontrolle mit im Gel aufgetrennt. Hierdurch kann beobachtet werden, wie das Fusionsprotein, das zunächst reichlich im Zelllysat vorhanden ist, durch die Inkubation mit der GST-Agarose aus diesem entfernt wird. Um die Menge des aufgereinigten Fusionsproteins abschätzen zu können, wurden zudem bekannte Mengen an BSA (1 μ g, 3 μ g, 10 μ g) im Gel mitgeführt und deren Bandenstärke mit der des Fusionsproteins verglichen. In Abbildung 31 sind die angefertigten Kontrollgele gezeigt. Die jeweiligen Fusionsproteine (Pfeil) sind in allen Aufreinigungen nachweisbar. Zusätzliche Banden im Bereich von 25 bis 30 kDa stellen vermutlich Degradationsprodukte der Fusionsproteine dar. Auch das ungekoppelte GST-Protein wurde im *E.coli*-Stamm BL21 exprimiert und aus dem erhaltenen Zelllysat aufgereinigt (G). In den nachfolgenden GST-Pulldown-Versuchen soll es als Negativkontrolle dienen, um unspezifische Bindungen an das GST-Protein bzw. die GST-Agarose von den spezifischen Bindungen an das TRPC4-Protein unterscheiden zu können.

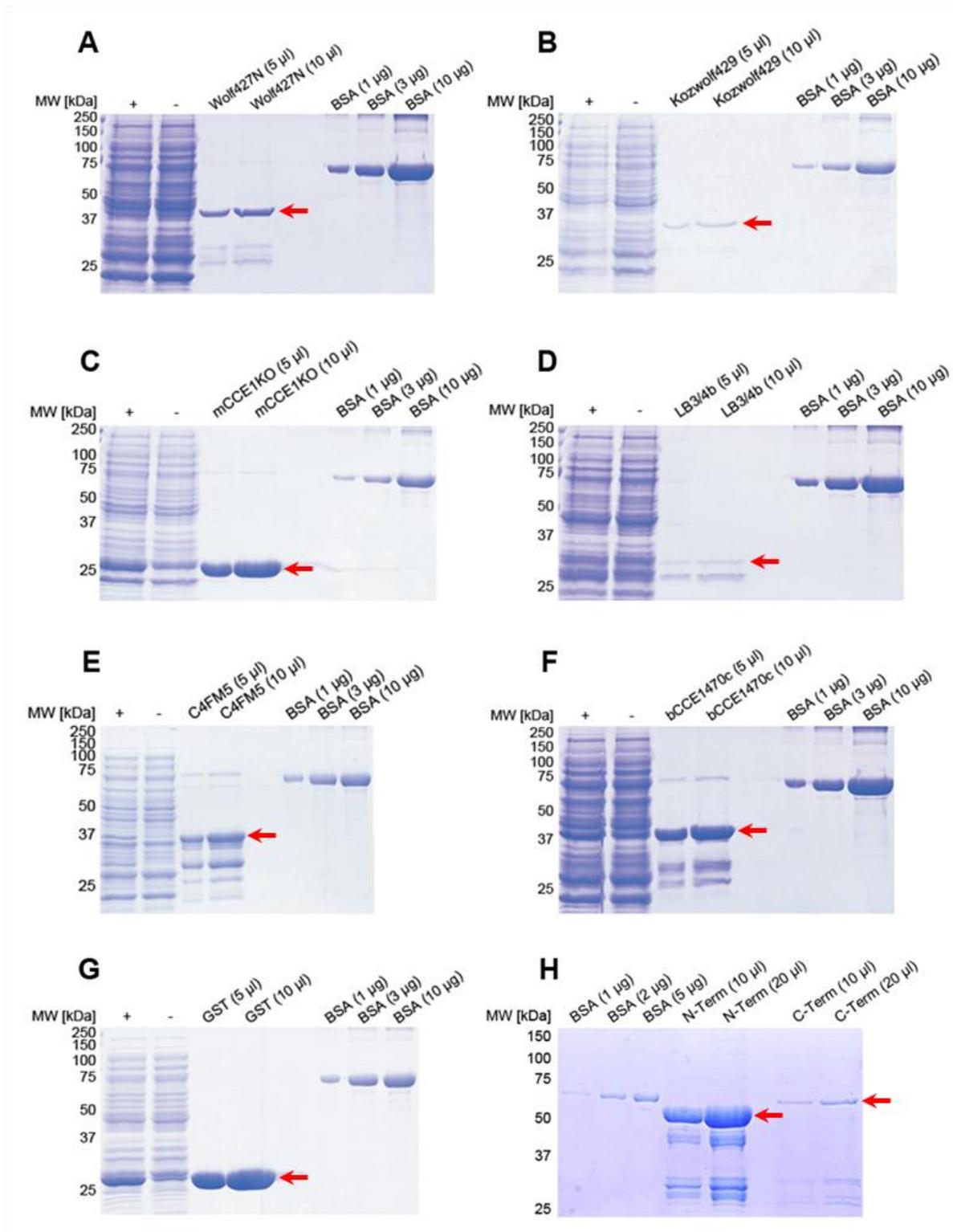


Abbildung 31: Kontrollgel der aufgereinigten GST-TRPC4-Fusionsproteine.

Nach Aufreinigung der Fusionsproteine wurden verschiedene Mengen in einem 12 %-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung im Gel sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurde ein Teil des Zelllysates vor (+) und nach (-) der Inkubation mit GST-Agarose mitaufgetragen. Um die Menge an aufgereinigtem Fusionsprotein abschätzen zu können, wurden bekannte Mengen an BSA im Gel mitgeführt. Die in (H) gezeigten Fusionsproteine wurden von Lorenz Latta aus der Arbeitsgruppe exprimiert, aufgereinigt und im Gel überprüft.

4.5.2.2 GST-Pulldown-Versuch aus mit Fryl-IRES-GFP transfizierten HEK293-Zellen

Die aufgereinigten TRPC4-Fusionsproteine wurden nachfolgend eingesetzt, um die Bindung von TRPC4 und Fryl näher zu charakterisieren. Hierzu wurde eine mittlere Kulturflasche (75 cm²) stabil mTRPC4 exprimierender HEK293-Zellen (HEK mC4) mit dem Konstrukt Fryl-IRES-GFP transfiziert und nach 48 Std. geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml 1 x Solubilisierungspuffer (inkl. Proteaseinhibitoren) aufgenommen und die Proteine mithilfe von 1 % Digitonin solubilisiert (3.2.2.8.2). Nachdem unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt worden waren, wurde das erhaltene Zellextrakt gleichmäßig auf die verschiedenen GST-TRPC4-Fusionproteine verteilt. 12 µg der Fusionproteine waren hierbei zuvor entnommen und mit Solubilisierungspuffer äquilibriert worden. Nach dem Eluieren und Denaturieren der Proteine wurden diese in einem NuPAGE Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt. Um eine unspezifische Bindung an das GST-Protein von einer spezifischen an Bereiche des TRPC4-Proteins unterscheiden zu können, wurde ein Teil des Zelllysates mit aufgereinigtem GST inkubiert. Eine Probe des eingesetzten es wurde ebenfalls im Gel aufgetrennt.

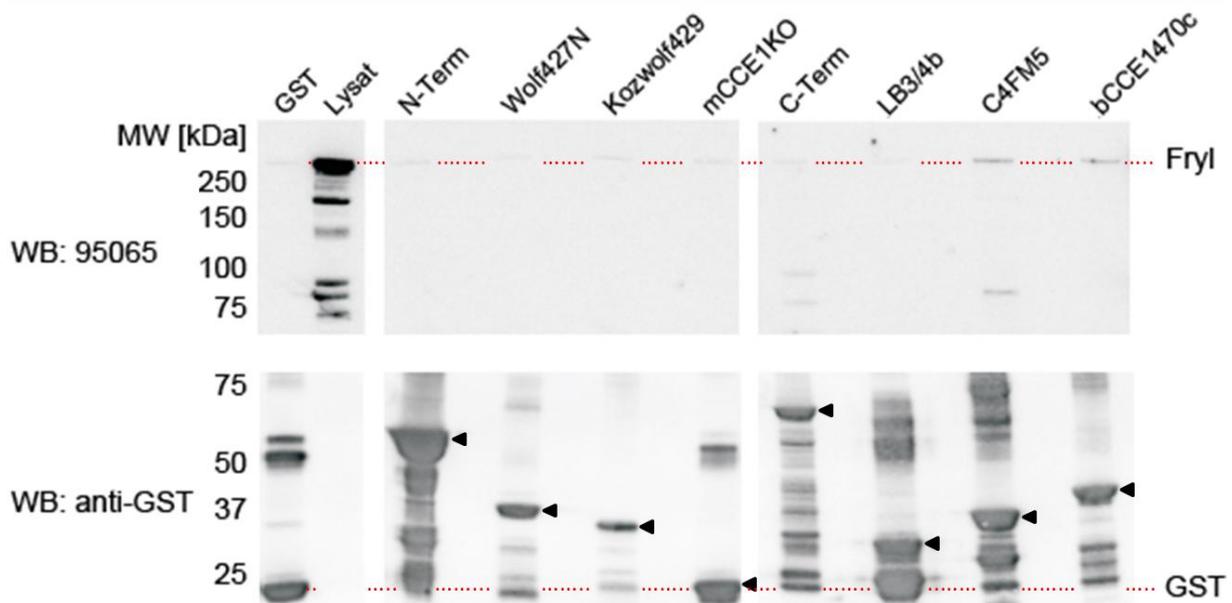


Abbildung 32: Lokalisierung des Interaktionsbereiches von TRPC4 mit dem Fryl-Protein mithilfe des GST-Pulldown Versuches.

HEK mC4 Zellen waren 48 Std. nach Transfektion mit dem Konstrukt Fryl-IRES-GFP geerntet und das erhaltene Zelllysate mit 12 µg der verschiedenen GST-TRPC4-Fusionproteine inkubiert worden. Das Eluat wurde in einem NuPAGE Gel (4-12 %) aufgetrennt und zunächst das Fryl-Protein mit dem Antikörper 95065 detektiert (oben). Anschließend wurden die Antikörper entfernt und die verschiedenen GST-Fusionsproteine auf der Membran nachgewiesen (unten). Der Interaktionsbereich zwischen Fryl und TRPC4 scheint im Bereich von Fusionsprotein C4FM5 und bCCE1 470c zu liegen.

Durch Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Antikörper 95065 wurde zunächst das Fryl-Protein detektiert. Abbildung 32 (oben) zeigt, dass Fryl im Bereich von 340 kDa im Zelllysate sehr deutlich zu detektieren ist. Aber auch in allen weiteren Ansätzen ist ein schwaches Signal auf gleicher Höhe zu erkennen. Durch Vergleich mit dem Signal in der GST-Kontrolle, das etwa von gleicher Intensität ist, wird deutlich, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung des Fryl-Proteins an das GST-Protein oder die verwendete Agarose handelt. In den Ansätzen mit den Fusionsproteinen C4FM5 (bTRPC4 AS 763-856) und bCCE1 470c (bTRPC4 AS 844-981) ist hingegen ein deutlich stärkeres Signal zu detektieren als in den übrigen Ansätzen. Der Interaktionsbereich des TRPC4-Proteins mit Fryl lässt sich daher auf diesen Abschnitt, der den C-terminal lokalisierten Aminosäure 761-974 des murinen TRPC4-Proteins entspricht, eingrenzen (Abbildung 33). Um zu überprüfen, ob in den verschiedenen Pulldown-Ansätzen etwa gleiche Mengen an Fusionsprotein eingesetzt wurden, wurden die Fryl-Antikörper von der Membran entfernt und diese mit einem GST-spezifischen Antikörper inkubiert. Die detektierten Fusionsproteine sind in Abbildung 32 (unten) mit einem Pfeil markiert. Die Signale zeigen eine etwa vergleichbare Intensität. Eine vermehrte Bindung von Fryl an Fusionsprotein C4FM5 und bCCE1 ist daher nicht auf einen übermäßigen Einsatz dieser Proteine im Pulldown-Versuch zurückzuführen. In Abbildung 33 ist noch einmal der ermittelte Bindungsbereich von TRPC4 mit dem Fryl-Protein schematisch dargestellt.

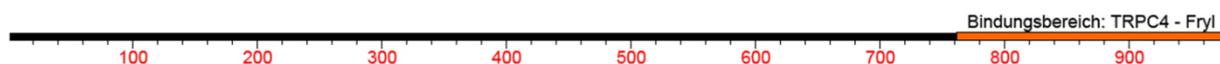


Abbildung 33: Interaktionsbereich von TRPC4 mit dem Fryl-Protein.

Orange dargestellt ist der Interaktionsbereich von TRPC4 mit dem Fryl-Protein. Durch den GST-Pulldown-Versuch konnte dieser auf die C-terminal lokalisierten Aminosäuren 761-974 des murinen TRPC4-Proteins eingegrenzt werden.

4.5.3 Funktionelle Charakterisierung der TRPC4-Fryl-Interaktion – Einflusses der TRPC4-Fryl-Interaktion auf den Carbachol-induzierten Kalziumeinstrom

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen TRPC4 und Fryl näher zu untersuchen, wurden stabil mit mTRPC4 transfizierte HEK293-Zellen, die zusätzlich den muskarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 2 exprimieren (HEK4 α M₂R), mit den Konstrukten Fryl-IRES-GFP bzw. IRES-GFP transfiziert. Die Zellen wurden für 24 Std. bzw. 48 Std. kultiviert und anschließend für 30 Min. mit dem Farbstoff FURA-2 AM beladen. Die Messungen wurden wie in 3.2.6 beschrieben durchgeführt.

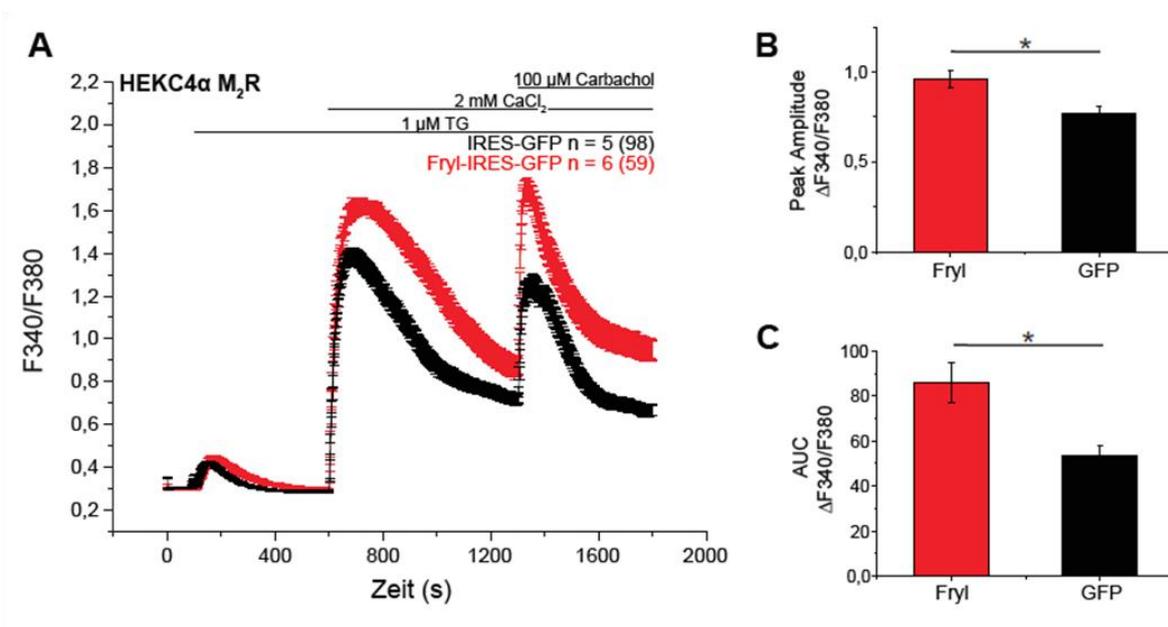


Abbildung 34: Carbachol-induzierter Ca²⁺-Einstrom in Fryl-transfizierte HEK4 α M₂R 24 Std. nach Transfektion.

Mittels FURA-2 wurde die zytosolische Ca²⁺-Konzentration nach Carbachol-Stimulation in HEK4 α M₂R gemessen, die mit den Konstrukten Fryl-IRES-GFP (rot) bzw. IRES-GFP (schwarz) transfiziert waren (A). Gezeigt ist das Mittel aus insgesamt 6 Experimenten mit 59 Zellen (Fryl-IRES-GFP) bzw. 5 Experimenten mit 98 Zellen (IRES-GFP). Die ermittelte Amplitude (B) und die Fläche unter der Kurve (AUC; 1300 Sek. bis 1700 Sek.) nach Carbachol-Stimulation sind in (B) bzw. (C) gezeigt ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; *, $p < 0,05$).

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Messungen 24 Std. nach Transfektion. Die Zellen befanden sich zu Beginn der Messung in Ca²⁺-freiem FURA-Puffer. In Abbildung 34 A ist zu sehen, dass die zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen in Fryl-transfizierten Zellen (rot) und Kontrollzellen (schwarz) zu diesem Zeitpunkt gleich sind. Die Zugabe von 1 μ M Thapsigargin nach 100 Sek. führt über die Hemmung der Ca²⁺-ATPase des endoplasmatischen Retikulums zu einer Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher und aktiviert die sogenannten “store-operated channels“. Durch Anheben der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 0 mM auf 2 mM nach 600 Sek. kann nun ein deutlicher Ca²⁺-Einwärtsstrom durch

diese Kanalproteine gemessen werden. Dieser stellt sich in den Fryl-transfizierten Zellen deutlich höher dar als in den Kontrollzellen. Nach 1200 Sek. wurde durch Applikation von Carbachol über den M₂-Rezeptor der TRPC4-Kanal aktiviert. In beiden Zellpopulationen ist ein Ca²⁺-Einwärtsstrom zu messen. Erneut fällt dieser in den Fryl-transfizierten Zellen signifikant höher aus, was sich durch die Berechnung der maximalen Amplitude der ermittelten Kurve (B) und der Fläche unter der Kurve (C) bestätigen lässt.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Messungen 48 Std. nach Transfektion zusammengefasst. Auch hier sind die intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen zu Beginn der Messung in beiden Zellpopulationen in etwa gleich hoch. Nach Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher mittels Thapsigargin und Anheben der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist sowohl in Fryl-transfizierten als auch in Kontrollzellen ein deutlicher und in etwa gleich großer Ca²⁺-Einstrom zu messen. Die Aktivierung des TRPC4-Kanals durch Carbachol-Applikation nach 1300 Sek. führt erneut zu einem Ca²⁺-Einstrom. In den Fryl-transfizierten Zellen steigt hierbei die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erneut höher als in den Kontrollzellen. Die Amplitude der ermittelten Kurve (B) und die Fläche unter der Kurve (C) weisen jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.

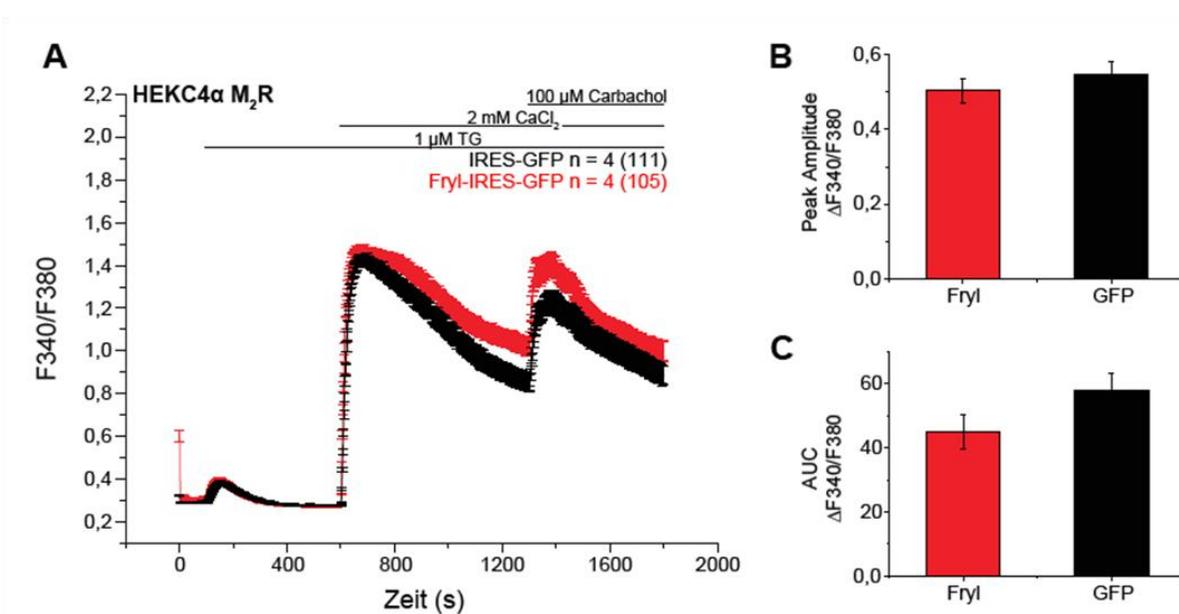


Abbildung 35: Messung des Carbachol-induzierten Ca²⁺-Einstroms in HEKC4α M₂R 48 Std. nach Transfektion.

Mittels FURA-2 wurde die zytosolische Ca²⁺-Konzentration nach Carbachol-Stimulation in HEKC4α M₂R gemessen, die mit den Konstrukten Fryl-IRES-GFP (rot) bzw. IRES-GFP (schwarz) transfiziert waren (A). Gezeigt ist das Mittel aus insgesamt 4 Experimenten mit 105 Zellen (Fryl-IRES-GFP) bzw. 111 Zellen (IRES-GFP). Die ermittelte Amplitude (B) und die Fläche unter der Kurve (AUC; 1300 Sek. bis 1700 Sek.) nach Carbachol-Stimulation sind in (B) bzw. (C) gezeigt (x ± SEM).

4.6 Bestätigung und weitere Charakterisierung der Proteininteraktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1

4.6.1 Ko-Immünpräzipitation von TRPC4 und Liprin-beta-1 aus transfizierten HEK293-Zellen

Die Interaktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1 war in 4.3.2 mittels Ko-Immünpräzipitation aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen, in denen Liprin-beta-1 in geringen Mengen bereits endogen exprimiert wird, bestätigt worden. Um auch hier die Interaktion mit einem weiteren unabhängigen Experiment zu belegen, wurde in stabil mit mTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen (HEK mTRPC4) Liprin-beta-1 überexprimiert und aus dem Zelllysat erneut eine Ko-Immünpräzipitationen angefertigt (IP7). Drei Kulturschälchen mit HEK mTRPC4 wurden dazu 48 Std. nach Transfektion mit dem Konstrukt Liprin-beta-1-IRES-GFP geerntet und in 2 ml Solubilisierungspuffer (inkl. 1 % Digitonin und Proteaseinhibitoren) aufgenommen.

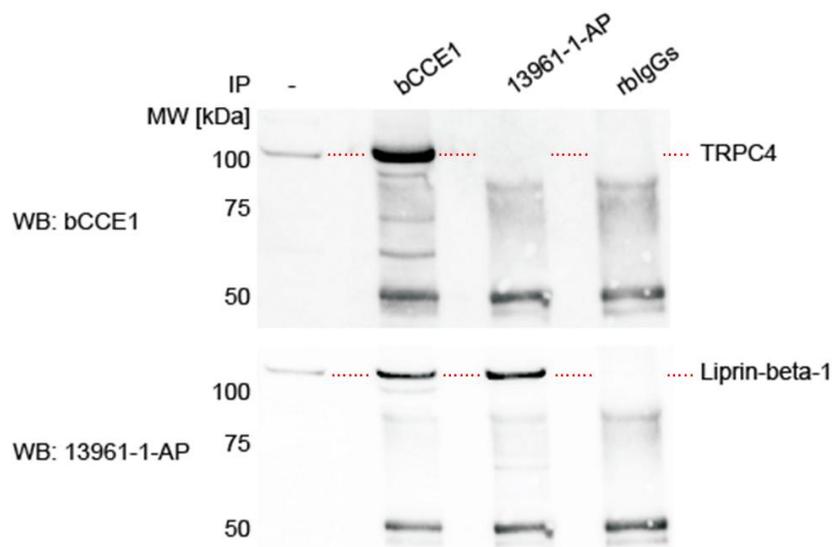


Abbildung 36: Ko-Immünpräzipitation von TRPC4 und Liprin-beta-1 aus HEK mC4 Zellen, die mit Liprin-beta-1-IRES-GFP transfiziert wurden (IP7).

Die mit Liprin-beta-1-IRES-GFP transfizierten HEK mC4 Zellen wurden nach 48 Std. geerntet und aus dem erhaltenen Zelllysat Anreicherungen mit den Antikörpern bCCE1, 13961-1-AP (anti-Liprin-beta-1) und unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen (rblgGs) angefertigt. Die Eluate und eine Probe des eingesetzten Zellextraktes ("IP-") wurden in einem NuPAGE Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt. Nach dem Western Blotting wurde zunächst TRPC4 auf der Membran detektiert (oben). Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und diese mit dem Antikörper 13961-1-AP inkubiert (unten).

Wie in 3.2.2.8.2 beschrieben wurden die Proteine solubilisiert und der Zellextrakt anschließend mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper bCCE1 bzw. dem gegen Liprin-beta-1 gerichteten Antikörper 13961-1-AP inkubiert. Diese waren zuvor nicht-kovalent an

magnetische ProteinA Beads gekoppelt worden (3.2.2.8.4). Als Kontrolle dienten Anreicherungen mit unspezifischen Kaninchen-Antikörpern. Eine Probe des eingesetzten Zelllysates und die erhaltenen Eluate wurden in einem NuPAGE Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt. Im nachfolgenden Western Blot wurde zunächst TRPC4 detektiert. In Abbildung 36 (oben) ist das Signal des TRPC4-Proteins im Bereich von 100 kDa im Zellextrakt (IP-) und in deutlich stärkerem Maße in der Anreicherung mit Antikörper bCCE1 zu erkennen. In der Kontrollanreicherung mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen kann TRPC4 nicht nachgewiesen werden. Auch durch Anreicherung des Liprin-beta-1-Proteins lässt sich TRPC4 nicht mitanreichern. Die gebundenen Antikörper wurden nun von der Membran entfernt und diese mit dem Liprin-beta-1-spezifischen Antikörper 13961-1-AP inkubiert. Liprin-beta-1 wird sowohl im Zelllysate, als auch in der spezifischen Anreicherung deutlich erkannt. Entsprechende Signale im Bereich von 110 kDa sind in der Kontrolle nicht zu identifizieren. Zusätzlich ist es aber auch in der Anreicherung mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper nachweisbar. Dieser Sachverhalt unterstützt noch einmal die Vermutung, dass beide Proteine als Proteinkomplex miteinander interagieren.

4.6.2 Lokalisierung der TRPC4-Liprin-beta-1-Interaktion mithilfe von GST-Pulldown-Versuchen

Der Bereich des TRPC4-Proteins, der mit Liprin-beta-1 in Wechselwirkung tritt, sollte im Folgenden mithilfe des GST-Pulldown-Versuches bestimmt werden. Eine mittlere Kulturflasche (75 cm²) stabil mTRPC4 exprimierender HEK293-Zellen wurde dazu mit dem Konstrukt Liprin-beta-1-IRES-GFP transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen geerntet, die Proteine solubilisiert und das erhaltene Zellextrakt (3.2.2.8.2) mit jeweils 12 µg der verschiedenen GST-TRPC4-Fusionsproteine (Abbildung 31) inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der nur das aufgereinigte GST enthielt. Die eluierten Proteine wurden anschließend in einem NuPAGE Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt und ein Western Blot mit dem Liprin-beta-1-spezifischen Antikörper NBP1 durchgeführt. In Abbildung 37 ist in der ersten Spur ein starkes Signal im Bereich von 110 kDa nachweisbar, was bestätigt, dass Liprin-beta-1 in den transfizierten Zellen deutlich exprimiert wurde. In der Kontrollanreicherung mit GST kann Liprin-beta-1 hingegen nicht identifiziert werden, offensichtlich liegt also keine unspezifische Bindung dieses Proteins an GST oder das verwendete Säulenmaterial vor. Durch Betrachtung der Signale in den Anreicherungen mit

den verschiedenen GST-TRPC4-Fusionsproteinen wird deutlich, dass Liprin-beta-1 vermehrt an die Fusionsproteine C-Term, LB3/4b und C4FM5 bindet. Hier ist das Signal von Liprin-beta-1 im Bereich von 100 kDa zu detektieren, während es in allen weiteren Eluaten fehlt.

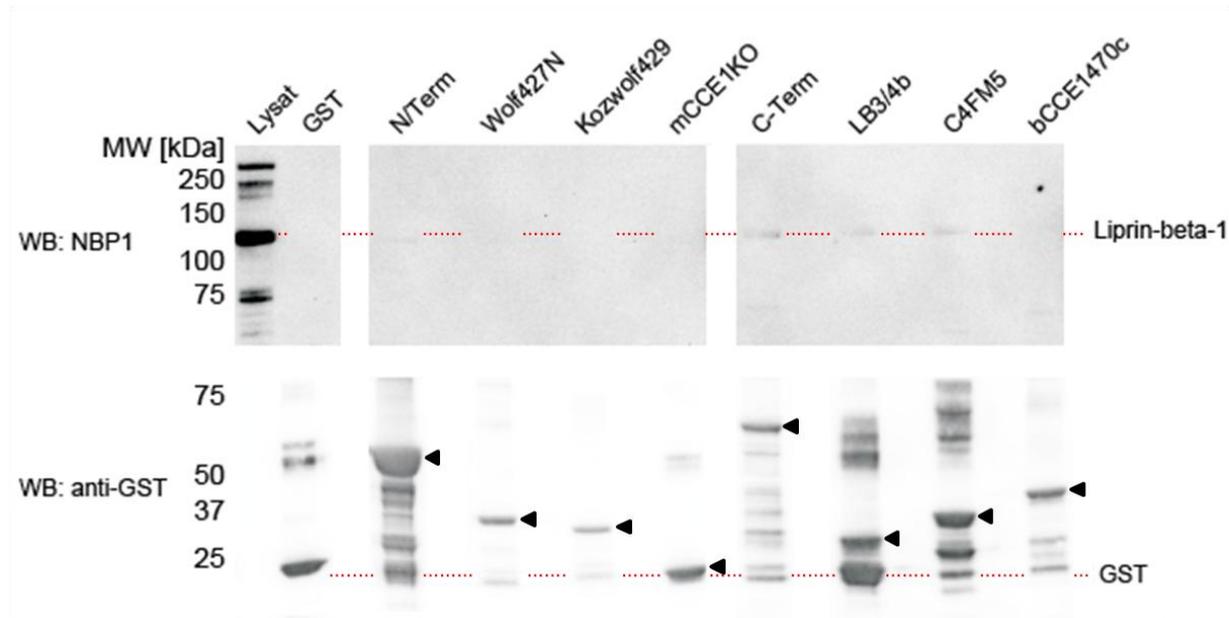


Abbildung 37: Lokalisierung des Bindungsbereiches von TRPC4 an Liprin-beta-1 mithilfe des GST-Pulldown-Versuches.

Eine mittlere Kulturflasche stabil mTRPC4 exprimierender HEK293-Zellen wurde 48 Std. nach Transfektion mit dem Konstrukt Liprin-beta-1-IRES-GFP geerntet. Das erhaltene Zellextrakt wurde mit jeweils 12 µg der verschiedenen GST-TRPC4-Fusionsproteine inkubiert, aufgereinigtes GST wurde hierbei als Kontrolle eingesetzt. Nach dem Eluieren wurden die Proteine in einem NuPAGE Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetrennt. Auf der Membran wurde zunächst Liprin-beta-1 nachgewiesen (oben), anschließend wurden die Antikörper entfernt und die Fusionsproteine detektiert (unten). Die Interaktion von TRPC4 mit Liprin-beta-1 scheint sich im Bereich der Fusionsprotein LB3/4b und C4FM5 zu vollziehen.

Um die Menge der für den Pulldown-Versuch eingesetzten Fusionsproteine zu bestimmen, wurden im nächsten Schritt gebundene Antikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt und diese mit einem gegen das GST-Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Die verschiedenen Fusionsproteine sind in Abbildung 37 (unten) mit einem Pfeil markiert. Zu sehen ist, dass sich die Signalstärken der detektierten Proteine geringfügig unterscheiden. Eine vermehrte Bindung von Liprin-beta-1 an die oben genannten Fusionsproteine lässt sich hierdurch jedoch nicht erklären. Offensichtlich scheint der Bereich von mTRPC4, der den Fusionsproteinen C-Term (mTRPC4 AS 621-974), LB3/4b (mTRPC4 AS 688-759) und C4FM5 (bTRPC4 AS 763-856) entspricht, mit Liprin-beta-1 zu interagieren. In Abbildung 38 ist noch einmal schematisch die Lage des identifizierten Interaktionsbereiches des TRPC4-Proteins mit Liprin-beta-1 dargestellt.

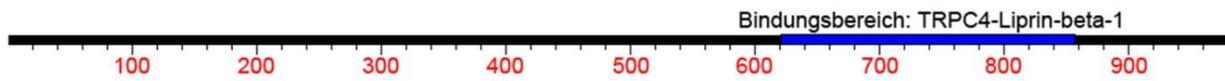


Abbildung 38: Interaktionsbereich des TRPC4-Proteins mit Liprin-beta-1.

Blau dargestellt ist der im Pulldown-Versuch identifizierte Interaktionsbereich von TRPC4 mit Liprin-beta-1. Er umfasst die Aminosäuren 621 bis 856 des murinen TRPC4-Proteins.

4.6.3 Funktionelle Charakterisierung der TRPC4-Liprin-beta-1-Interaktion – Einfluss der TRPC4-Liprin-beta-1-Interaktion auf den Carbachol-induzierten Kalziumeinstrom

Mithilfe des Farbstoffes FURA-2 sollte die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1 näher charakterisiert werden. Dazu wurden HEK293 Zellen mit dem Konstrukt Liprin-beta-1-IRES-GFP bzw. IRES-GFP transfiziert. Nach Kultivierung für 24 Std. bzw. 48 Std. wurden die Zellen für 30 Min. mit 5 μM FURA-2 inkubiert und anschließend wie in 3.2.6 beschrieben die Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durchgeführt.

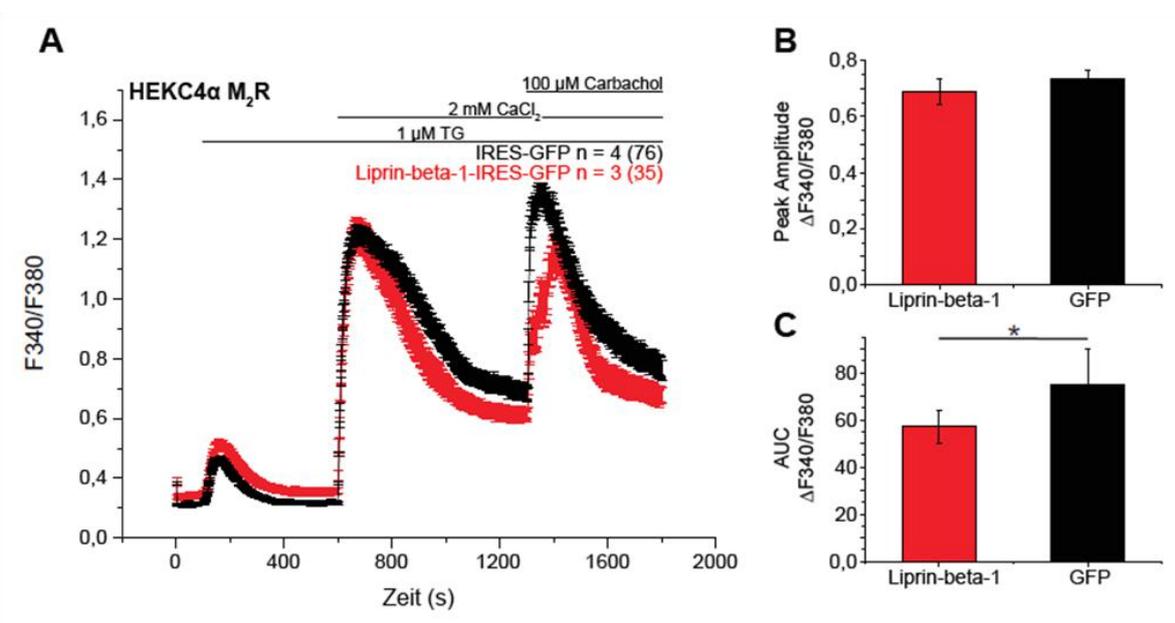


Abbildung 39: Carbachol-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Liprin-beta-1-transfizierte HEK293 Zellen 24 Std. nach Transfektion.

Mittels FURA-2 wurde die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Carbachol-Stimulation in HEK293 Zellen gemessen, die mit den Konstrukten Liprin-beta-1-IRES-GFP (rot) bzw. IRES-GFP (schwarz) transfiziert waren (A). Gezeigt ist das Mittel aus insgesamt 3 Experimenten mit 35 Zellen (Liprin-beta-1-IRES-GFP) bzw. 4 Experimenten mit 76 Zellen (IRES-GFP). Die ermittelte Amplitude (B) und die Fläche unter der Kurve (AUC; 1300 Sek. bis 1700 Sek.) nach Carbachol-Stimulation sind in (B) bzw. (C) gezeigt ($x \pm \text{SEM}$; *, $p < 0,05$).

In Abbildung 39 A sind die Ergebnisse der Messungen 24 Std. nach Transfektion dargestellt. Bei Messungsbeginn weisen beide Zellpopulationen eine in etwa gleich hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf, die der Liprin-beta-1-transfizierten Zellen liegt leicht über der Ca^{2+} -Konzentration in den Kontrollzellen. Durch Applikation von Thapsigargin nach 100 Sek. werden zunächst die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher geleert. Der anschließend gemessene Ca^{2+} -Einstrom durch die “store-operated channels“, der durch Anhebung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst wird, stellt sich in beiden Zellpopulationen gleich hoch dar. 1300 Sek. nach Messungsbeginn wird mithilfe von Carbachol über den M_2 -Rezeptor der TRPC4-Kanal aktiviert. Beide Zellpopulationen antworten mit einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. In den Liprin-beta-1 transfizierten Zellen fällt diese Antwort etwas geringer aus als in den Kontrollzellen. Dies spiegelt sich auch in der Amplitude der ermittelten Kurve (B) wieder und in der Fläche unter der Kurve (C), die in den Liprin-beta-1 transfizierten Zellen signifikant erniedrigt ist.

Abbildung 40 fasst die Ergebnisse der Messungen 48 Std. nach Transfektion zusammen.

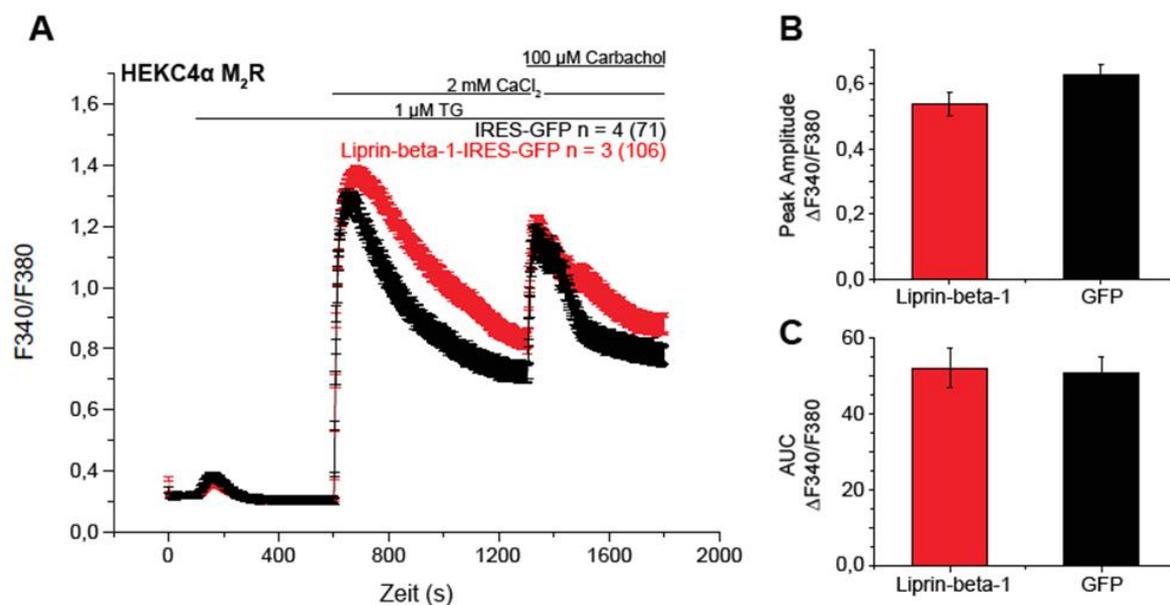


Abbildung 40: Carbachol-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Liprin-beta-1-transfizierte HEKC4 α M_2R 48 Std. nach Transfektion.

Mittels FURA-2 wurde die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Carbachol-Stimulation in HEKC4 α M_2R gemessen, die mit den Konstrukten Liprin-beta-1-IRES-GFP (rot) bzw. IRES-GFP (schwarz) transfiziert waren (A). Gezeigt ist das Mittel aus insgesamt 3 Experimenten mit 106 Zellen (Fryl-IRES-GFP) bzw. 4 Experimenten mit 71 Zellen (IRES-GFP). Die ermittelte Amplitude (B) und die Fläche unter der Kurve (AUC; 1300 Sek. bis 1700 Sek.) nach Carbachol-Stimulation sind in (B) bzw. (C) gezeigt ($x \pm \text{SEM}$).

In beiden Zellpopulationen liegen bei Messungsbeginn gleiche intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen vor. Durch Entleerung der intrazellulären Speicher mittels Thapsigargin und

anschließende Applikation von 2 mM Calciumchlorid wird ein Ca^{2+} -Einstrom durch die “store-operated channels“ ausgelöst. Dieser ist in Liprin-beta-1-transfizierten Zellen und Kontrollzellen in etwa gleich groß. Die anschließende durch die Aktivierung des TRPC4-Kanals vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung ist in beiden Zellpopulationen gleich groß. Daher ist auch in der Amplitude der ermittelten Kurve (B) und in der Fläche unter der Kurve (C) kein signifikanter Unterschied festzustellen.

5 Diskussion

Seit seiner erstmaligen Klonierung aus dem Nebennierengewebe von Rind im Jahr 1996 (Philipp et al. 1996) wurden verschiedene physiologische Prozesse beschrieben, an denen der TRPC4-Kationenkanal maßgeblich beteiligt ist. Permeabilität und Vasotonus von Gefäßen (Freichel et al. 2001; Tiruppathi et al. 2002), die Motilität des Gastrointestinaltraktes (Tsvilovsky et al. 2009) und die Verarbeitung visueller Informationen in bestimmten Bereichen des Thalamus (Munsch et al. 2003) scheinen durch Ca^{2+} -Signale moduliert zu werden, die über TRPC4 vermittelt werden. Sowohl der Aktivierungsmechanismus als auch Möglichkeiten zur Regulation der Kanalaktivität sind bis dato jedoch nicht endgültig aufgedeckt. Angenommen wird jedoch, dass der TRPC4-Kanal wie auch andere Membranproteine (Fares et al. 2011) vielfältige Proteininteraktionen eingeht und dadurch in unterschiedliche Signalwege eingebunden ist. Um weitere Einblicke in die Funktion des TRPC4-Kanals zu gewinnen und mögliche Ansatzpunkte einer medikamentösen Beeinflussung des Proteins zu identifizieren, ist es daher zunächst notwendig Interaktionspartner des TRPC4-Kanalproteins zu finden und funktionelle Aspekte dieser Protein-Wechselwirkungen herauszuarbeiten. In meiner Arbeit wurde hierzu eine Antikörper-Affinitätschromatographie in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse verwendet. Voraussetzung für eine spezifische und affine Anreicherung des TRPC4-Proteins mit assoziierten Proteinen ist die Verwendung eines spezifischen und gleichzeitig möglichst sensitiven TRPC4-Antikörpers. Der erste Schritt meiner Arbeit bestand daher darin, einen solchen Antikörper zu identifizieren.

5.1 Bewertung von Sensitivität und Spezifität TRPC4-spezifischer Antikörper

Zu Beginn meiner Arbeit lagen in der Arbeitsgruppe verschiedene Antikörper vor, die durch Immunisierung von Kaninchen mit TRPC4-Peptiden hergestellt worden waren und somit das TRPC4-Protein erkennen sollten. Ihre Spezifität und Sensitivität gegenüber TRPC4 war jedoch noch nicht experimentell überprüft worden. Der erste Schritt bestand daher darin, die

Fähigkeit der Antikörper zu untersuchen, TRPC4 spezifisch sowohl in endogen TRPC4-exprimierenden als auch in heterologen Zellsystemen zu detektieren. Dazu wurden Zelllysate von SBAC-Zellen, die TRPC4 endogen exprimieren, und von mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Western Blotting TRPC4 mit den verschiedenen Antikörpern detektiert. Das Proteinlysate nicht transfizierter HEK293-Zellen, in denen TRPC4 nicht nachweisbar sein sollte, diente als Kontrolle. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass einige der zur Detektion eingesetzten Antikörper (1091, 706, 981) das bTRPC4-Protein nicht erkennen. Ursächlich hierfür könnte sein, dass zur Herstellung dieser Antikörper Peptide eingesetzt wurden, die der murinen Aminosäuresequenz des TRPC4-Proteins entsprechen. Sequenzunterschiede zwischen bovinem und murinem TRPC4 im Bereich der jeweiligen Epitope könnten so dazu führen, dass die eingesetzten Antikörper nur das TRPC4-Protein von Maus erkennen, jedoch nicht das der anderen Spezies. Mit dem Antikörper 781 ist das TRPC4-Protein sowohl im Lysat der HEK bC4-Zellen als auch der SBAC-Zellen nachweisbar. Zusätzlich sind im Western Blot jedoch unspezifische Signale erkennbar. Es werden offensichtlich neben TRPC4 weitere Proteine erkannt, deren Identität nicht bekannt ist. Möglicherweise enthalten diese ähnliche Aminosäuresequenzen wie das zur Immunisierung eingesetzte Peptid. Aufgrund der mangelnden Spezifität gegenüber TRPC4 ist der Antikörper 781 daher nicht geeignet zur Detektion und Anreicherung des Ionenkanals. Die Antikörper bCCE1, 236b und Sun113 hingegen erkennen das TRPC4-Protein sehr spezifisch. Dies wird darin deutlich, dass in den TRPC4-exprimierenden Zelllinien (HEK bC4, SBAC) ein deutliches Antikörper-Signal im Bereich von 100 kDa zu erkennen ist, wohingegen dieses in den HEK293-Zellen fehlt. Gleichzeitig sind die mit dem Antikörper 781 detektierten unspezifischen Banden mit diesen Antikörpern nicht zu erkennen. Das stärkste TRPC4-Signal ist hierbei mit dem polyklonalen Antikörper bCCE1 zu detektieren. Zur Herstellung dieses Antikörpers wurden Kaninchen mit einem 136-Aminosäure-langen rekombinanten Protein immunisiert. Dieses weist aufgrund seiner Größe im Vergleich zu dem Sun113-Peptid und dem 236b-Peptid mehr unterschiedliche Epitope auf. Im erhaltenen Serum ist daher eine Vielzahl an unabhängigen Antigen-bindenden Immunglobulinen enthalten, sodass das TRPC4-Protein sehr sensitiv nachgewiesen werden kann. Das 236b-Peptid bietet mit einer Länge von 14 Aminosäuren hingegen weniger Epitope an. Folglich entstehen weniger unabhängige Antigen-bindende Antikörper, was das schwächere Signal im Western Blot erklären könnte. Der monoklonale Antikörper Sun113 richtet sich im Gegensatz zu den polyklonalen Antikörpern nur gegen ein einziges Epitop des TRPC4-Proteins. TRPC4 wird

folglich sehr spezifisch im Western Blot detektiert. Möglicherweise ist die Affinität des Antikörpers und somit auch dessen Sensitivität jedoch geringer, was sich in dem schwachen Western Blot Signal widerspiegeln könnte.

5.2 Anreicherung des TRPC4-Proteins unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Eines der am häufigsten angewandten Verfahren, um natürlich vorkommende Protein-Interaktionen nachzuweisen, ist die Ko-Immunpräzipitation (Masters 2004). In meiner Arbeit sollten mithilfe dieser Methode mögliche Interaktionspartner des TRPC4-Kationenkanals identifiziert werden. Aufgrund der biochemischen Vielfältigkeit an Protein-Interaktionen ist es jedoch nicht möglich die Versuchsbedingungen einer Ko-Immunpräzipitation zu standardisieren (Masters 2004). Vielmehr müssen diese je nach untersuchtem Protein variiert und angepasst werden, um eine optimale Anreicherung des Zielproteins mit assoziierten Proteinen zu gewährleisten. Ein Parameter, der das Ergebnis einer Ko-Immunpräzipitation beeinflusst, ist der zur Anreicherung des Zielproteins eingesetzte Antikörper (Elion 2006). Polyklonale Antikörper wie Antikörper bCCE1 oder 236b richten sich gegen viele verschiedene Epitope des Zielproteins. Daher sind sie im Allgemeinen besser geeignet, um das Zielprotein mit daran assoziierten Proteinen möglichst stark anzureichern. Dadurch dass sie an wechselnde Epitope des Zielproteins binden, wird weiterhin verhindert, dass eine ganz spezifische Protein-Interaktion des Zielproteins die Antikörperbindung blockiert. Gleichzeitig ist bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern jedoch die Gefahr erhöht, dass unspezifische Proteine gebunden werden und so fälschlicherweise als Interaktionspartner des Zielproteins angesehen werden. Entsprechende Kontrollen - z.B. mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen - sind daher erforderlich (Schulte et al. 2011). Die Ergebnisse der IP4 und IP5 mit dem polyklonalen Antikörper bCCE1 bestätigen die obigen Aussagen. In Abbildung 16 ist zu sehen, dass TRPC4 deutlich aus HEK bC4- und SBAC-Zellen angereichert werden konnte. In massenspektrometrischen Analysen der Lysate wurden anschließend sowohl TRPC4 als auch weitere Proteine, die mögliche Interaktionspartner von TRPC4 darstellen, nachgewiesen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der IP3 mit dem monoklonalen Antikörper Sun113, so stellt man fest, dass in letzterer TRPC4 deutlich schlechter angereichert wurde (Abbildung 14). Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass sich

der monoklonale Antikörper nur gegen ein einziges Epitop des Zielproteins richtet. Dieses wird daher zwar spezifisch, aber verglichen mit polyklonalen Antikörpern schwächer angereichert. Weiterhin können Zielproteine, die im Bereich des Epitops des monoklonalen Antikörpers Interaktionen ausbilden, nicht immunpräzipitiert werden, da dieses Epitop dem Antikörper nicht zugänglich ist. Zur Identifikation von Protein-Interaktionen des TRPC4-Proteins wurde daher in meiner Arbeit der polyklonale Antikörper bCCE1 eingesetzt.

Neben dem präzipitierenden Antikörper ist das Gewebe bzw. die Zelllinie, aus der das Zielprotein isoliert werden soll, von entscheidender Bedeutung. In IP3 wurde das TRPC4-Protein aus Hirngewebe von Maus angereichert. Obwohl TRPC4 nur in ausgewählten Arealen des Gehirns (Hippocampus, Gyrus dentatus) exprimiert wird, musste für die Immunpräzipitation das gesamte Hirngewebe von Maus eingesetzt werden, da die Zielareale von den nicht-TRPC4-exprimierenden makroskopisch nicht zu trennen sind. Das eingesetzte Gewebe enthielt daher verhältnismäßig wenig TRPC4-Protein, was neben der Verwendung des monoklonalen Antikörpers Sun13 ein weiterer Grund dafür sein könnte, dass TRPC4 in IP3 nur schwach angereichert werden konnte (Abbildung 14). In IP4 und IP5 hingegen wurde das Zellysate von stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen eingesetzt. In diesem heterologen Zellsystem ist das TRPC4-Protein deutlich stärker exprimiert als in nativen Geweben, was eine Anreicherung mit assoziierten Proteinen mittels Immunpräzipitation erleichtert. Ein unnatürlich hohes Expressionslevel birgt jedoch gleichzeitig die Gefahr, dass das Zielprotein unkontrollierte Protein-Interaktionen eingeht (Elion 2006), sodass Proteine als Interaktionspartner identifiziert werden, die dies physiologischerweise nicht sind. In meiner Arbeit wurden daher parallel zu den Anreicherungen aus HEK bC4-Zellen Immunpräzipitationen aus SBAC-Zellen angefertigt. Die aus der Nebennierenrinde von Rind stammende Zelllinie enthält TRPC4 endogen, sodass eine ausreichende Isolierung von TRPC4 möglich ist, was in der Western Blot Kontrolle von IP4 und IP5 zu sehen ist (Abbildung 16). Da das Expressionslevel von TRPC4 jedoch nicht verändert ist, kann davon ausgegangen werden, dass keine unphysiologischen Protein-Interaktionen eingegangen werden.

Ein dritter Parameter, der einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation und der anschließenden massenspektrometrischen Identifizierung von Interaktionspartnern nimmt, ist der Solubilisierungspuffer. Dieser muss so gewählt werden, dass zum einen das Zielprotein selbst, gleichzeitig aber auch daran assoziierte Interaktionspartner effektiv und schonend solubilisiert werden (Schulte et al. 2011). Kritisch

zu betrachten ist hierbei der Einsatz von Detergenzien. Diese sind für die Solubilisierung von Membranproteinen wie TRPC4 zwar notwendig, können gleichzeitig aber zur Denaturierung des Zielproteins führen und somit nicht-kovalente Protein-Interaktionen zerstören. Bei der Herstellung eines Proteinextraktes muss daher ein Detergens eingesetzt werden, das ausreichend solubilisiert, gleichzeitig aber bestehende Proteinkomplexe bewahrt. Diese Kriterien erfüllen vor allem nicht-ionische Detergenzien, zu denen auch die in meiner Arbeit verwendeten Detergenzien n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM), Nonidet P40, und Digitonin zählen. Durch Solubilisierung mit Nonidet P40 und geringen Konzentrationen des ionischen Detergens Desoxycholat in IP3 konnte TRPC4 aus Hirngewebe von Maus zwar angereichert werden, Interaktionspartner dieses Kanalproteins konnten massenspektrometrisch jedoch nicht identifiziert werden. Dies könnte zum einen auf die niedrige Expression von TRPC4 im verwendeten Gewebe oder den präzipitierenden Antikörper zurückzuführen sein oder aber auf die eingesetzten Detergenzien, die die Proteinkomplexe nicht ausreichend schützen könnten. Weitere Versuche müssten durchgeführt werden, wobei neben dem Detergens auch Ionenstärke und pH-Wert variiert werden sollten. Da es mehrere Arbeiten gibt, in denen Protein-Interaktionen nur bei Solubilisierung mit Digitonin nachgewiesen werden konnten (Meyer et al. 2007; Huckabee und Jekabsons 2011), wurde in den Immunpräzipitationen IP4 und IP5 dieses Detergens eingesetzt. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, wurde TRPC4 hierbei deutlich aus HEK bC4- und SBAC-Zellen angereichert. Durch massenspektrometrische Analyse der erhaltenen Lysate konnten zusätzlich Proteine identifiziert werden, die putative Interaktionspartner von TRPC4 darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die besten Ergebnisse in der Immunpräzipitation und anschließenden massenspektrometrischen Analyse aus HEK bC4- und SBAC-Zellen unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers bCCE1 und des Detergens Digitonin erzielt wurden.

5.3 Analyse der massenspektrometrischen Daten

In den Immunpräzipitationen IP4 und IP5 war die Anreicherung des TRPC4-Proteins aus HEK bC4- und SBAC-Zellen durch Verwendung des polyklonalen Antikörpers bCCE1 und des Detergens Digitonin optimiert worden. Die erhaltenen Eluate wurden nach Kontrolle der TRPC4-Anreicherung im Western Blot (Abbildung 16) genutzt, um durch massen-

spektrometrische Analysen putative Interaktionspartner dieses Kanalproteins zu identifizieren. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist wurden in den Eluaten der IP4 und IP5 bis zu 131 Proteine nachgewiesen. Um unter diesen diejenigen auszuwählen, die aufgrund einer Interaktion mit TRPC4 mitangereichert wurden und nicht aufgrund einer unspezifischen Bindung an das Säulenmaterial, die Reaktionsgefäße oder bestimmte Bereiche der präzipitierenden Antikörper, war es notwendig Negativkontrollen zur Verfügung zu haben. Üblicherweise fertigt man hierzu parallel zu den spezifischen Anreicherungen Immunpräzipitationen mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen an (Schulte et al. 2011). Die hier verwendeten Immunglobuline waren aus dem Kaninchenserum vor Immunisierung mit dem TRPC4-Peptid isoliert worden. Durch Abgleich der in den spezifischen Anreicherungen identifizierten Proteine mit den Kontrollen konnten so Proteine gefunden werden, die als Interaktionspartner von TRPC4 in Frage kommen. Neben den Anreicherungen mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen könnten auch Immunpräzipitationen mit dem TRPC4-spezifischen Antikörper bCCE1 aus HEK293-Zellen bzw. TRPC4-deletierten SBAC-Zellen als Kontrollen eingesetzt werden.

Dem TRPC4-Protein zugehörige Peptide wurden in allen spezifischen Anreicherungen sowohl aus HEK bC4- als auch aus SBAC-Zellen nachgewiesen. Gleichzeitig waren sie in keiner der Kontrollen zu identifizieren (siehe Tabelle 9), was die Spezifität der angewandten Methode belegt.

Verschiedene Kriterien wurden aufgestellt, um aus der Vielzahl an identifizierten Proteinen mögliche Interaktionspartner von TRPC4 auszuwählen. Zum einen musste das Protein mit mindestens zwei unabhängigen Peptiden in beiden spezifischen Anreicherungen aus HEK bC4- bzw. SBAC-Zellen oder speziesübergreifend in mindestens drei der spezifischen Anreicherungen nachgewiesen werden. Weiterhin durfte das Protein in keiner der Kontroll-Anreicherungen mit mehr als einem Peptid detektierbar sein. In Abbildung 18 sind die 13 Proteine aufgelistet, die diesen Kriterien entsprechen und somit mögliche Interaktionspartner von TRPC4 darstellen.

5.3.1 Fryl als möglicher Interaktionspartner des TRPC4-Proteins

Eines der Proteine, das die aufgestellten Kriterien eines möglichen TRPC4-Interaktionspartners erfüllt, ist das "Fryl-Protein" oder "Protein furry homolog-like". Es wurde in allen spezifischen Anreicherungen sowohl aus HEK bC4- als auch aus SBAC-Zellen

nachgewiesen. Das 340 kDa große Fryl-Protein ist Teil der Furry-Proteinfamilie, der neben dem humanen Fryl-Protein entsprechende Proteine aus Maus und *Drosophila melanogaster* angehören. Der Datenbank "Human Protein Reference Database" (<http://www.hprd.org>) ist zu entnehmen, dass das Fryl-Protein in unterschiedlichsten Geweben exprimiert wird, darunter auch Hirngewebe (Hippocampus, Cerebellum, Corpus callosum, Retina) Niere, Nebenniere, Hoden und Herz. Hier liegt eine eindeutige Überlappung mit dem Expressionsmuster des TRPC4-Proteins vor, was für eine physiologische Bedeutung der Interaktion sprechen könnte.

5.3.1.1 Domänen des Fryl-Proteins

Über die Funktion des Fryl-Proteins ist bis dato nur sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, dass es an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Zell-Morphogenese (Cong et al. 2001) beteiligt ist. Während das Programm "PSORT II Prediction", das anhand der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über dessen subzelluläre Lokalisation trifft, das Fryl-Protein als plasmamembranär einstuft (43,5 % Plasmamembran; 17,4 % nukleär; 13,0 % vakuolär), wird es im "Human Protein Atlas" als ein cytoplasmatisches Protein deklariert. Die Datenlage ist hier widersprüchlich. Eine weitere Möglichkeit die Lokalisation und Struktur eines Proteins anhand der Aminosäuresequenz zu untersuchen bietet der Kyte-Doolittle-Plot. Hierbei wird jeder Aminosäure eines Proteins entsprechend ihrer Löslichkeit ein Hydrophobizitäts-Wert zwischen -4,6 (stark hydrophil) und 4,6 (stark hydrophob) zugeordnet. Transmembranäre Regionen eines Proteins stellen hierbei mindestens 19 Aminosäure-lange Bereiche dar mit einem Hydrophobizitäts-Wert von mehr als 1,6.

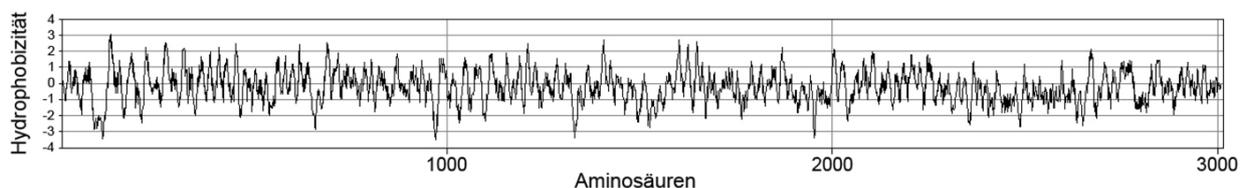


Abbildung 41: Hydrophobizitätsplot des Fryl-Proteins nach Kyte-Doolittle.

Zu sehen ist ein mit Accelrys Gene erstellter Hydrophobizitätsplot nach Kyte-Doolittle der Aminosäuresequenz des Fryl-Proteins (Kyte und Doolittle 1982). Jeder Aminosäure wird hierbei entsprechend ihrer Löslichkeit ein Hydrophobizitäts-Wert zwischen -4,6 (stark hydrophil) und 4,6 (stark hydrophob) zugeordnet. Für die Berechnungen wurde eine Fensterbreite von 10 Aminosäuren gewählt, d.h. die Hydrophobizitäts-Werte von jeweils 10 Aminosäuren wurden gemittelt und der ersten Aminosäure des betrachteten Fensters zugeordnet.

In Abbildung 41 wird deutlich, dass das Fryl-Protein solche Transmembrandomänen nicht aufweist und daher eine rein plasmamembranäre Lokalisation unwahrscheinlich erscheint.

Möglicherweise stellt das Fryl-Protein aber ein cytoplasmatisches Protein dar, das an bestimmten Bereichen in der Plasmamembran verankert ist. Weitere Untersuchungen beispielsweise mittels Immunhistochemie sind erforderlich, um die genaue Lokalisation des Fryl-Proteins zu bestimmen.

Die Analyse der Aminosäuresequenz mit dem Server ELM (The eukaryotic linear motif resource for functional sites in proteins) ergab, dass das Fryl-Protein zahlreiche Aminosäuremotife aufweist, die Protein-Interaktionen vermitteln, darunter mehrere SH2- und SH3-Bindedomänen und eine PDZ-Bindedomäne. Fryl könnte daher in Zellsystemen als Gerüstprotein fungieren, das durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen am Aufbau funktionell wirksamer Proteinkomplexe beteiligt sein könnte. Über die PDZ-Bindedomäne könnte es auch mit dem TRPC4-Kanalprotein, das ebenfalls eine solche Domäne aufweist, in Wechselwirkung treten.

5.3.1.2 Funktionelle Bedeutung der Fryl-TRPC4-Interaktion

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von TRPC4 mit dem Fryl-Protein möglicherweise die Aktivität des Kanalproteins beeinflusst, wurde mithilfe des Farbstoffes FURA-2 der Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in Fryl-transfizierte HEK293-Zellen, die bereits das mTRPC4 α -Protein und den muscarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 2 exprimieren (HEK4 α M₂R), gemessen (4.5.3). In Abbildung 34 und Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Messungen 24 Std. bzw. 48 Std. nach Transfektion zusammengefasst. Die Ergebnisse sind allerdings als vorläufig anzusehen, da sowohl die Anzahl der Experimente als auch die Zahl der in die Auswertung eingeschlossenen Zellen zu gering sind, um endgültige Aussagen treffen zu können. Die Messungen nach 24 Std. ergaben, dass der Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in den Fryl-transfizierten Zellen größer ausfällt, als in den Kontrollzellen. Sowohl die Amplitude der ermittelten Kurve als auch die Fläche unter der Kurve sind signifikant erhöht. 48 Std. nach Transfektion ergaben die Messungen der Amplitude und der Fläche unter der Kurve keinen signifikanten Unterschied mehr. Betrachtet man jedoch nur das Ca^{2+} -Niveau nach Carbachol-Stimulation, so liegt dieses in den Fryl-transfizierten Zellen erneut über dem der Kontrollzellen. Möglicherweise führt also die Interaktion von TRPC4 mit dem Fryl-Protein zu einer gesteigerten Aktivität des Kanals und so zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Eine 2008 veröffentlichte Arbeit zeigt, dass die Interaktion des TRPC4-Proteins mit dem Spektrin-Zytoskelett den korrekten Einbau des Kanals in die Plasmamembran verstärkt und so zu einer erhöhten Kanalaktivität beiträgt (Odell et al. 2008). Spektrin-

Proteine sind ca. 250 kDa große Proteine, die an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt sind und dieses über die Interaktion mit Ankyrinen mit der Plasmamembran verbinden. Vergleicht man nun das Fryl-Protein mit den Proteinen der Spektrin-Familie so kann man durchaus Parallelen erkennen, sowohl hinsichtlich Proteingröße als auch Proteinstruktur. Zudem scheinen beide Proteine in Wechselwirkung mit dem Aktin-Zytoskelett zu stehen. Es ist daher möglich, dass das Fryl-Protein in ähnlicher Weise wie Spektrine auch mit dem TRPC4-Kanalprotein interagiert und über einen verstärkten Einbau dieses Kanals in die Plasmamembran dessen Aktivität erhöht. Denkbar wäre aber auch, dass das Fryl-Protein selbst ein Kanal-Protein darstellt. Hierdurch wäre der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom in die Fryl-transfizierten Zellen bereits nach Thapsigargin-Stimulation zu erklären (Abbildung 34). Ein mögliches Experiment um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, wäre die Messung des Thapsigargin-Stimulierten Ca^{2+} -Einstroms in HEK293-Zellen, die nur das Fryl-Protein, nicht aber TRPC4 exprimieren. Zusammenfassend kann an dieser Stelle gesagt werden, dass die Interaktion zwischen TRPC4 und Fryl in der vorliegenden Arbeit ausreichend belegt wurde. Welche funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkung zuzuschreiben ist, bleibt zunächst jedoch größtenteils noch Spekulation.

5.3.2 Liprin-beta-1 als möglicher Interaktionspartner des TRPC4-Proteins

Ein zweites Protein, das in SBAC-Zellen massenspektrometrisch als putativer Interaktionspartner des TRPC4-Kanals identifiziert wurde, ist Liprin-beta-1, auch als PPFIBP1 (Protein tyrosine phosphatase receptor type 1 polypeptide-interacting protein-binding protein 1) bezeichnet. Dieses ca. 110 kDa große Protein gehört der Familie der Liprin-Proteine (LAR-interacting protein) an, die ihren Namen der Interaktion mit sog. LAR Protein-Tyrosin-Phosphatasen verdankt. Anhand ihrer Aminosäuresequenz werden die Liprin-Proteine in zwei Subfamilien eingeteilt: zum einen in die Liprin-alpha Subfamilie, die sich aus vier Vertretern zusammensetzt (Liprin-alpha-1 bis 4), zum anderen in die Liprin-beta Subfamilie, die Liprin-beta-1 und Liprin-beta-2 umfasst.

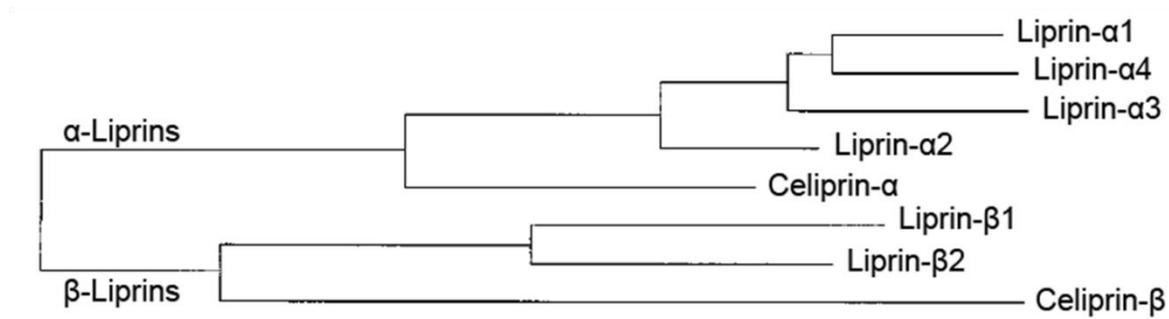


Abbildung 42: Phylogenetischer Stammbaum der Liprin-Proteine.

Die Familie der Liprin-Proteine setzt sich aus zwei Subfamilien zusammen, den Liprin-alpha- und den Liprin-beta-Proteinen. Neben den in Säugern beschriebenen Genen, wurden auch in *C. elegans* orthologe Gene identifiziert (modifiziert nach (Serra-Pages et al. 1998)).

5.3.2.1 Domänen und bekannte Funktionen des Liprin-beta-1 Proteins

Gemeinsam ist den Liprinen beider Subfamilien, dass sie über N-terminal lokalisierte Coiled-coil-Domänen homodimere (Serra-Pages et al. 1998) und über C-terminal gelegene SAM-Domänen heterodimere Strukturen (Kriajevska et al. 2002) bilden können. Alpha-Liprine können über ihren C-Term mit sog. LAR (leukocyte common antigen-related) Protein-Tyrosin-Phosphatasen, einer Gruppe von transmembranären Protein-Phosphatasen, interagieren (Serra-Pages et al. 1998) und so deren Aktivität modulieren. Für beta-Liprine konnte diese Wechselwirkung direkt nicht nachgewiesen werden. Da jedoch eine Interaktion zwischen alpha- und beta-Liprinen bekannt ist (Serra-Pages et al. 1998), ist eine indirekte Beeinflussung dieser Tyrosin-Phosphatasen durch beta-Liprine dennoch möglich (Kriajevska et al. 2002).

Liprin-beta-1 wird in verschiedensten Geweben exprimiert, darunter Hirn (Hippocampus, Amygdala, Cerebellum, Corpus Callosum), Niere, Herz, Hoden und Plazenta. Das Expressionsmuster überlappt deutlich mit dem des TRPC4-Proteins. Subzellulär ist Liprin-beta-1 vermutlich zytoplasmatisch lokalisiert (Serra-Pages et al. 1998; Kriajevska et al. 2002). Im Hydrophobizitätsplot nach Kyte-Doolittle weist es überwiegend negative Hydrophobizitäts-Werte auf (Abbildung 43), was diese Aussage noch einmal belegt.

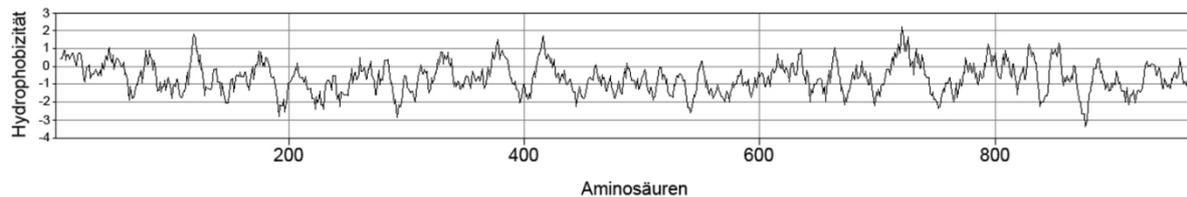


Abbildung 43: Hydrophobizitätsplot von Liprin-beta-1 nach Kyte-Doolittle.

Dargestellt ist ein mit Accelrys Gene erstellter Hydrophobizitätsplot nach Kyte-Doolittle der Aminosäuresequenz von Liprin-beta-1 (Kyte und Doolittle 1982). Jeder Aminosäure wird hierbei entsprechend ihrer Löslichkeit ein Hydrophobizitäts-Wert zwischen -4,6 (stark hydrophil) und 4,6 (stark hydrophob) zugeordnet. Für die Berechnungen wurde eine Fensterbreite von 10 Aminosäuren gewählt, d.h. die Hydrophobizitäts-Werte von jeweils 10 Aminosäuren wurden gemittelt und der ersten Aminosäure des betrachteten Fensters zugeordnet.

Neben einer Interaktion mit alpha-Liprinen wurde eine Wechselwirkung von Liprin-beta-1 mit dem Protein S100A4, einem Vertreter der Calcium-bindenden S100-Proteinfamilie beschrieben (Kriajevska et al. 2002). Die genaue Funktion von Liprin-beta-1 ist bislang jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Eine 2010 veröffentlichte Arbeit zeigte, dass Liprin-beta-1 ein wichtiger Faktor ist, um die Integrität lymphatischer Gefäße aufrechtzuerhalten (Norrmen et al. 2010). Weiterhin wird aufgrund seiner über alpha-Liprine vermittelten Interaktion mit den LAR Protein-Tyrosin-Phosphatasen vermutet, dass es an Zellkommunikation und Signaltransduktion beteiligt sein könnte.

5.3.2.2 Funktionelle Bedeutung der Liprin-beta-1-Interaktion

Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen TRPC4 und Liprin-beta-1 eine funktionelle Relevanz hat, wurde mittels FURA-2 der Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in Liprin-beta-1-transfizierte HEK293 M₂R gemessen (4.6.3). Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind aufgrund der geringen Anzahl an durchgeführten Experimenten und an ausgewerteten Zellen nur als orientierend einzustufen. Weitere Messungen müssten zur Bestätigung durchgeführt werden. Abbildung 39 und Abbildung 40 fassen die Ergebnisse der Messungen 24 Std. bzw. 48 Std. nach Transfektion zusammen. 24 Std. nach Transfektion ist kein Unterschied im Carbachol-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zwischen Liprin-beta-1-transfizierten HEK293 M₂R und Kontrollzellen zu erkennen. Sowohl die Amplituden der ermittelten Kurven als auch die Flächen unter den Kurven weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Werden die Messungen jedoch 48 Std. nach Transfektion durchgeführt, so scheint der Ca^{2+} -Einstrom in Liprin-beta-1-transfizierte HEK293 M₂R reduziert zu sein, was in einer

verminderten Fläche unter der Kurve zum Ausdruck kommt. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den Messungen 24 Std. bzw. 48 Std. nach Transfektion lassen sich dadurch erklären, dass zu den jeweiligen Zeitpunkten verschiedene Mengen an Liprin-beta-1 in den Zellen exprimiert waren. Möglicherweise war nach 24 Std. noch nicht ausreichend Liprin-beta-1 gebildet, um einen Effekt auf die Ca^{2+} -Ströme messen zu können. Wie genau das Liprin-beta-1-Protein die Kanalaktivität des TRPC4-Kationenkanals beeinflusst bleibt jedoch noch ungeklärt. Weitere Untersuchungen werden folgen müssen, um diese Frage beantworten zu können.

6 Literaturverzeichnis

Berkefeld, H., C. A. Sailer, W. Bildl, V. Rohde, J. O. Thumfart, S. Eble, N. Klugbauer, E. Reisinger, J. Bischofberger, D. Oliver, H. G. Knaus, U. Schulte and B. Fakler (2006). "BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling." Science **314**(5799): 615-620.

Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.

Bezzerrides, V. J., I. S. Ramsey, S. Kotecha, A. Greka and D. E. Clapham (2004). "Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels." Nat Cell Biol **6**(8): 709-720.

Bretscher, A., D. Reczek and M. Berryman (1997). "Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures." J Cell Sci **110** (Pt **24**): 3011-3018.

Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi and P. G. Righetti (2004). "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." Electrophoresis **25**(9): 1327-1333.

Chait, B. T. (2006). "Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down?" Science **314**(5796): 65-66.

Chrambach, A., R. A. Reisfeld, M. Wyckoff and J. Zaccari (1967). "A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem **20**(1): 150-154.

Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-2175.

Cioffi, D. L., S. Wu, M. Alexeyev, S. R. Goodman, M. X. Zhu and T. Stevens (2005). "Activation of the endothelial store-operated ISOC Ca²⁺ channel requires interaction of protein 4.1 with TRPC4." Circ Res **97**(11): 1164-1172.

Cong, J., W. Geng, B. He, J. Liu, J. Charlton and P. N. Adler (2001). "The furry gene of Drosophila is important for maintaining the integrity of cellular extensions during morphogenesis." Development **128**(14): 2793-2802.

Cosens, D. J. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant." Nature **224**(5216): 285-287.

Elion, E. A. (2006). "Detection of protein-protein interactions by coprecipitation." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 20**: Unit20 25.

- Fares, M. A., M. X. Ruiz-Gonzalez and J. P. Labrador (2011). "Protein coadaptation and the design of novel approaches to identify protein-protein interactions." IUBMB Life **63**(4): 264-271.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417.
- Flockerzi, V. (2007). "An introduction on TRP channels." Handb Exp Pharmacol(179): 1-19.
- Freichel, M., U. Schweig, S. Stauffenberger, D. Freise, W. Schorb and V. Flockerzi (1999). "Store-operated cation channels in the heart and cells of the cardiovascular system." Cell Physiol Biochem **9**(4-5): 270-283.
- Freichel, M., S. H. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weissgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi and B. Nilius (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice." Nat Cell Biol **3**(2): 121-127.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-182.
- Gospodarowicz, D., C. R. Ill, P. J. Hornsby and G. N. Gill (1977). "Control of bovine adrenal cortical cell proliferation by fibroblast growth factor. Lack of effect of epidermal growth factor." Endocrinology **100**(4): 1080-1089.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." Electrophoresis **9**(1): 28-32.
- Hofmann, T., A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann and G. Schultz (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." Nature **397**(6716): 259-263.
- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz and T. Gudermann (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7461-7466.
- Holmes, D. S. and M. Quigley (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Anal Biochem **114**(1): 193-197.
- Holzer, P. (2011). "Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system." Pharmacol Ther **131**(1): 142-170.

- Huckabee, D. B. and M. B. Jekabsons (2011). "Identification of Bax-voltage-dependent anion channel 1 complexes in digitonin-solubilized cerebellar granule neurons." J Neurochem **119**(5): 1137-1150.
- Inoue, R. and Y. Mori (2003). "New target molecules in the drug control of blood pressure and circulation." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **3**(1): 59-72.
- Kriajevska, M., M. Fischer-Larsen, E. Moertz, O. Vorm, E. Tulchinsky, M. Grigorian, N. Ambartsumian and E. Lukanidin (2002). "Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1)." J Biol Chem **277**(7): 5229-5235.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lajdova, I., A. Oksa, A. Spustova and R. Dzurik (2012). "[Chronic kidney disease and cellular calcium homeostasis]." Vnitr Lek **58**(7-8): 525-530.
- Maroto, R., A. Raso, T. G. Wood, A. Kurosky, B. Martinac and O. P. Hamill (2005). "TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells." Nat Cell Biol **7**(2): 179-185.
- Masters, S. C. (2004). "Co-immunoprecipitation from transfected cells." Methods Mol Biol **261**: 337-350.
- Mathie, A. (2010). "Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain." J Pharm Pharmacol **62**(9): 1089-1095.
- Merril, C. R., M. L. Dunau and D. Goldman (1981). "A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels." Anal Biochem **110**(1): 201-207.
- Mery, L., F. Magnino, K. Schmidt, K. H. Krause and J. F. Dufour (2001). "Alternative splice variants of hTrp4 differentially interact with the C-terminal portion of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." FEBS Lett **487**(3): 377-383.
- Meyer, B., I. Wittig, E. Trifilieff, M. Karas and H. Schagger (2007). "Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase." Mol Cell Proteomics **6**(10): 1690-1699.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-1323.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

- Munsch, T., M. Freichel, V. Flockerzi and H. C. Pape (2003). "Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 16065-16070.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-262.
- Norrmén, C., W. Vandeveld, A. Ny, P. Saharinen, M. Gentile, G. Haraldsen, P. Puolakkainen, E. Lukanidin, M. Dewerchin, K. Alitalo and T. V. Petrova (2010). "Liprin (beta)1 is highly expressed in lymphatic vasculature and is important for lymphatic vessel integrity." Blood **115**(4): 906-909.
- Odell, A. F., D. F. Van Helden and J. L. Scott (2008). "The spectrin cytoskeleton influences the surface expression and activation of human transient receptor potential channel 4 channels." J Biol Chem **283**(7): 4395-4407.
- Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto and Y. Mori (1999). "Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor." J Biol Chem **274**(39): 27359-27370.
- Pape, H. C., T. Munsch and T. Budde (2004). "Novel vistas of calcium-mediated signalling in the thalamus." Pflugers Arch **448**(2): 131-138.
- Philipp, S., A. Cavalie, M. Freichel, U. Wissenbach, S. Zimmer, C. Trost, A. Marquart, M. Murakami and V. Flockerzi (1996). "A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL." EMBO J **15**(22): 6166-6171.
- Philipp, S., J. Hambrecht, L. Braslavski, G. Schroth, M. Freichel, M. Murakami, A. Cavalie and V. Flockerzi (1998). "A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells." EMBO J **17**(15): 4274-4282.
- Putney, J. W. (2005). "Physiological mechanisms of TRPC activation." Pflugers Arch **451**(1): 29-34.
- Ramsey, I. S., M. Delling and D. E. Clapham (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 619-647.
- Riazantseva, M. A., G. N. Mozhaeva and E. V. Kaznacheeva (2012). "[Calcium hypothesis of Alzheimer disease]." Usp Fiziol Nauk **43**(4): 59-72.
- Schulte, U., C. S. Müller and B. Fakler (2011). "Ion channels and their molecular environments--glimpses and insights from functional proteomics." Semin Cell Dev Biol **22**(2): 132-144.

- Serra-Pages, C., Q. G. Medley, M. Tang, A. Hart and M. Streuli (1998). "Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins." J Biol Chem **273**(25): 15611-15620.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Tang, J., Y. Lin, Z. Zhang, S. Tikunova, L. Birnbaumer and M. X. Zhu (2001). "Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels." J Biol Chem **276**(24): 21303-21310.
- Tang, Y., J. Tang, Z. Chen, C. Trost, V. Flockerzi, M. Li, V. Ramesh and M. X. Zhu (2000). "Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF." J Biol Chem **275**(48): 37559-37564.
- Tiruppathi, C., M. Freichel, S. M. Vogel, B. C. Paria, D. Mehta, V. Flockerzi and A. B. Malik (2002). "Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability." Circ Res **91**(1): 70-76.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Trost, C., C. Bergs, N. Himmerkus and V. Flockerzi (2001). "The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins." Biochem J **355**(Pt 3): 663-670.
- Tsvilovskyy, V. V., A. V. Zholos, T. Aberle, S. E. Philipp, A. Dietrich, M. X. Zhu, L. Birnbaumer, M. Freichel and V. Flockerzi (2009). "Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo." Gastroenterology **137**(4): 1415-1424.
- Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
- Walker, R. L., J. R. Hume and B. Horowitz (2001). "Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles." Am J Physiol Cell Physiol **280**(5): C1184-1192.
- Wes, P. D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten and C. Montell (1995). "TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9652-9656.
- Wu, X., G. Babnigg, T. Zagranichnaya and M. L. Villereal (2002). "The role of endogenous human Trp4 in regulating carbachol-induced calcium oscillations in HEK-293 cells." J Biol Chem **277**(16): 13597-13608.
- Yang, H. and L. Z. Huang (1999). "[Calcium and chronic diseases]." Sheng Li Ke Xue Jin Zhan **30**(2): 123-128.

Yellen, G. (2002). "The voltage-gated potassium channels and their relatives." Nature **419**(6902): 35-42.

Zhu, X., M. Jiang, M. Peyton, G. Boulay, R. Hurst, E. Stefani and L. Birnbaumer (1996). "trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry." Cell **85**(5): 661-671.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammbaum der in Säugern vorhandenen Vertreter der TRP-Proteinfamilie.	7
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der TRPC-Proteine mit Darstellung der konservierten Aminosäuremotive M1 bis M4.	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des TRPC4-Kationenkanals.....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung des pBluescript II SK-.....	24
Abbildung 5: Vektorkarte des pCAGGS-IRES-GFP.....	24
Abbildung 6: Kovalente Kopplung von Antikörpern an Dynabeads M-280 Tosylactivated...	37
Abbildung 7: Darstellung des Verfahrens der Short-SDS-PAGE.....	40
Abbildung 8: Absorptionsspektrum des FURA-2 Farbstoffes bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen.	53
Abbildung 9: Überprüfung der Spezifität verschiedener Antikörper gegenüber dem bTRPC4-Protein mittels Western Blotting.	56
Abbildung 10: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen des TRPC4-Proteins unterschiedlicher Spezies.	59
Abbildung 11: Immunpräzipitation aus Hirnmikrosomen von Wildtyp- und TRPC4-Knockout-Tieren mit den Antikörpern bCCE1 und 236b (IP1).....	60
Abbildung 12: Anreicherung des TRPC4-Proteins aus mit bTRPC4 transfizierten COS-Zellen (IP2).....	61
Abbildung 13: Darstellung der in Bande 1 und 2 identifizierten Peptide des bTRPC4-Proteins.	62
Abbildung 14: Anreicherung des TRPC4-Proteins aus Hirngewebe von Maus (IP3).	63
Abbildung 15: Sequenzabdeckung des mTRPC4-Proteins nach Anreicherung mit dem Antikörper Sun113 aus Hirngewebe von Maus (IP3).	64
Abbildung 16: Zwei unabhängige Immunpräzipitation des TRPC4-Proteins aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen (IP4, IP5).	65
Abbildung 17: Sequenzabdeckung des TRPC4-Proteins aus IP4 und IP5.....	69

Abbildung 18: Auflistung massenspektrometrisch identifizierter, putativer TRPC4-Interaktionspartner.	71
Abbildung 19: Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Fryl aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen.	72
Abbildung 20: Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Liprin-beta-1 aus SBAC- und stabil mit bTRPC4 transfizierten HEK293-Zellen.	73
Abbildung 21: Amplifizierung der cDNS von mLiprin-beta-1 aus einer cDNS-Bibliothek von Hirngewebe von Maus.	75
Abbildung 22: Schematische Darstellung des generierten Plasmids Liprin-beta-1-IRES-GFP.	75
Abbildung 23: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz des Liprin-beta-1-Proteins von Maus, Rind und Mensch sowie des generierten Proteins.	77
Abbildung 24: Überprüfung der Proteinexpression von Liprin-beta-1 in transfizierten HEK293-Zellen.	78
Abbildung 25: Amplifizierung der cDNS von mFryl in drei Fragmenten und Klonierung in den Vektor pBluescript SK-.	80
Abbildung 26: Klonierungsstrategie der cDNS von mFryl in den pBluescript SK- und Umklonierung in den Vektor pCAGGS-IRES-GFP.	81
Abbildung 27: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz des Fryl-Protein von Maus und Mensch sowie der klonierten Sequenz.	85
Abbildung 28: Überprüfung der Expression des mFryl-Proteins in transfizierten HEK293-Zellen.	86
Abbildung 29: Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Fryl aus HEK mC4 Zellen, die mit Fryl-IRES-GFP transfiziert wurden (IP6).	88
Abbildung 30: Übersicht über die eingesetzten GST-TRPC4-Fusionsproteine.	89
Abbildung 31: Kontrollgel der aufgereinigten GST-TRPC4-Fusionsproteine.	91
Abbildung 32: Lokalisierung des Interaktionsbereiches von TRPC4 mit dem Fryl-Protein mithilfe des GST-Pulldown Versuches.	92
Abbildung 33: Interaktionsbereich von TRPC4 mit dem Fryl-Protein.	93
Abbildung 34: Carbachol-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Fryl-transfizierte HEK293 Zellen 24 Std. nach Transfektion.	94
Abbildung 35: Messung des Carbachol-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in HEK293 Zellen 48 Std. nach Transfektion.	95

Abbildung 36: Ko-Immunpräzipitation von TRPC4 und Liprin-beta-1 aus HEK mC4 Zellen, die mit Liprin-beta-1-IRES-GFP transfiziert wurden (IP7).	96
Abbildung 37: Lokalisierung des Bindungsbereiches von TRPC4 an Liprin-beta-1 mithilfe des GST-Pulldown-Versuches.	98
Abbildung 38: Interaktionsbereich des TRPC4-Proteins mit Liprin-beta-1.	99
Abbildung 39: Carbachol-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Liprin-beta-1-transfizierte HEK4 α M ₂ R 24 Std. nach Transfektion.	99
Abbildung 40: Carbachol-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Liprin-beta-1-transfizierte HEK4 α M ₂ R 48 Std. nach Transfektion.	100
Abbildung 41: Hydrophobizitätsplot des Fryl-Proteins nach Kyte-Doolittle.	108
Abbildung 42: Phylogenetischer Stammbaum der Liprin-Proteine.	111
Abbildung 43: Hydrophobizitätsplot von Liprin-beta-1 nach Kyte-Doolittle.	112

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten Erstantikörper	21
Tabelle 3: Liste der verwendeten Zweitantikörper.....	23
Tabelle 4: Liste verwendeter Proteinmarker	23
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.	25
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele	32
Tabelle 7: Versuchsbedingungen der durchgeführten Immunpräzipitationen.	36
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten TRPC4-Fusionsproteine	43
Tabelle 9: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von IP4 und IP5.....	67
Tabelle 10: Massenspektrometrische Ergebnisse der IP3.	124
Tabelle 11: Massenspektrometrische Ergebnisse der IP4 und IP5.	127

7.3 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen

Tabelle 10: Massenspektrometrische Ergebnisse der IP3.

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	Anzahl individueller Peptide (Signifikanzfilter > 90 %)
				Sun113
1	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10 OS=Mus musculus GN=Acad10 PE=2 SV=1	ACD10_MOUSE	119 kDa	3
2	Actin, aortic smooth muscle OS=Mus musculus GN=Acta2 PE=1 SV=1	ACTA_MOUSE (+3)	42 kDa	2
3	Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1	ACTB_MOUSE (+1)	42 kDa	11
4	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a4 PE=1 SV=4	ADT1_MOUSE	33 kDa	5
5	ADP/ATP translocase 2 OS=Mus musculus GN=Slc25a5 PE=1 SV=3	ADT2_MOUSE	33 kDa	14
6	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	ALBU_MOUSE	69 kDa	5
7	Alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2 OS=Mus musculus GN=Alg2 PE=2 SV=2	ALG2_MOUSE	47 kDa	2
8	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Atp1a3 PE=1 SV=1	AT1A3_MOUSE	112 kDa	2
9	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Bdh1 PE=1 SV=2	BDH_MOUSE	38 kDa	4
10	CUGBP Elav-like family member 4 OS=Mus musculus GN=Celf4 PE=1 SV=2	CELF4_MOUSE	52 kDa	2
11	Citrate synthase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cs PE=1 SV=1	CISY_MOUSE	52 kDa	5
12	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Mus musculus GN=Cnp PE=1 SV=3	CN37_MOUSE	47 kDa	7
13	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, brain isoform OS=Mus musculus GN=Cpt1c PE=2 SV=1	CPT1C_MOUSE	90 kDa	2
14	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase OS=Mus musculus GN=Decr2 PE=1 SV=1	DECR2_MOUSE	31 kDa	9
15	DnaJ homolog subfamily B member 6 OS=Mus musculus GN=Dnajb6 PE=1 SV=4	DNJB6_MOUSE	40 kDa	2
16	Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3 OS=Mus musculus GN=Dvl3 PE=1 SV=1	DVL3_MOUSE	78 kDa	2
17	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Dync1h1 PE=1 SV=2	DYHC1_MOUSE (+1)	532 kDa	2
18	Dynamin-1 OS=Mus musculus GN=Dnm1 PE=1 SV=2	DYN1_MOUSE	98 kDa	5
19	Far upstream element-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Khsrp PE=1 SV=2	FUBP2_MOUSE	77 kDa	10
20	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh PE=1 SV=2	G3P_MOUSE	36 kDa	15
21	Ig gamma-2A chain C region, A allele OS=Mus musculus GN=Ighg PE=1 SV=1	GCAA_MOUSE (+2)	36 kDa	4

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	Anzahl individueller Peptide (Signifikanzfilter > 90 %)
				Sun113
23	Mitochondrial glutamate carrier 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a22 PE=1 SV=1	GHC1_MOUSE	35 kDa	5
24	Histone H2B type 1-B OS=Mus musculus GN=Hist1h2bb PE=1 SV=3	H2B1B_MOUSE (+7)	14 kDa	3
25	Histone H4 OS=Mus musculus GN=Hist1h4a PE=1 SV=2	H4_MOUSE	11 kDa	4
26	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Hbb-b1 PE=1 SV=2	HBB1_MOUSE (+1)	16 kDa	2
27	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Hnrnpul1 PE=1 SV=1	HNRL1_MOUSE	96 kDa	3
28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Hnrnpul2 PE=1 SV=1	HNRL2_MOUSE	85 kDa	13
29	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Mus musculus GN=Hnrnpu PE=1 SV=1	HNRPU_MOUSE	88 kDa	5
30	Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	HPT_MOUSE	39 kDa	2
31	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Mus musculus GN=Hspa12a PE=1 SV=1	HS12A_MOUSE	75 kDa	2
32	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	HSP7C_MOUSE	71 kDa	4
33	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Mus musculus GN=Krt10 PE=1 SV=3	K1C10_MOUSE	58 kDa	12
34	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus GN=Krt14 PE=1 SV=2	K1C14_MOUSE	53 kDa	6
35	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Mus musculus GN=Krt16 PE=1 SV=3	K1C16_MOUSE	52 kDa	2
36	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Mus musculus GN=Krt17 PE=1 SV=3	K1C17_MOUSE	48 kDa	2
37	Keratin, type I cytoskeletal 42 OS=Mus musculus GN=Krt42 PE=1 SV=1	K1C42_MOUSE	50 kDa	2
38	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1	K22E_MOUSE	71 kDa	4
39	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Mus musculus GN=Krt1 PE=1 SV=4	K2C1_MOUSE	66 kDa	3
40	Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Mus musculus GN=Krt77 PE=1 SV=1	K2C1B_MOUSE	61 kDa	3
41	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1	K2C5_MOUSE	62 kDa	12
42	Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Mus musculus GN=Krt73 PE=1 SV=1	K2C73_MOUSE	59 kDa	2
43	Melanoma-associated antigen D1 OS=Mus musculus GN=Maged1 PE=1 SV=1	MAGD1_MOUSE	86 kDa	2
44	Serine/threonine-protein kinase MARK2 OS=Mus musculus GN=Mark2 PE=1 SV=3	MARK2_MOUSE	86 kDa	2
45	Myelin basic protein OS=Mus musculus GN=Mbp PE=1 SV=2	MBP_MOUSE	27 kDa	5
46	Mitochondrial carrier triple repeat protein 1 OS=Mus musculus GN=Mcart1 PE=2 SV=1	MCAR1_MOUSE	34 kDa	7
47	Mesoderm-specific transcript protein OS=Mus musculus GN=Mest PE=2 SV=1	MEST_MOUSE	39 kDa	3

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	Anzahl individueller Peptide (Signifikanzfilter > 90 %)
				Sun113
49	Major vault protein OS=Mus musculus GN=Mvp PE=1 SV=4	MVP_MOUSE	96 kDa	21
50	Unconventional myosin-Va OS=Mus musculus GN=Myo5a PE=1 SV=2	MYO5A_MOUSE	216 kDa	2
51	Myelin proteolipid protein OS=Mus musculus GN=Plp1 PE=1 SV=2	MYPR_MOUSE	30 kDa	4
52	Neurochondrin OS=Mus musculus GN=Ncdn PE=1 SV=1	NCDN_MOUSE	79 kDa	11
53	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Ndufa4 PE=1 SV=2	NDUA4_MOUSE	9 kDa	2
54	Protein NipSnap homolog 1 OS=Mus musculus GN=Nipsnap1 PE=1 SV=1	NIPS1_MOUSE	33 kDa	4
55	Protein NipSnap homolog 2 OS=Mus musculus GN=Gbas PE=2 SV=1	NIPS2_MOUSE	33 kDa	3
56	Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2	NSF_MOUSE	83 kDa	7
57	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pgam5 PE=2 SV=1	PGAM5_MOUSE	32 kDa	11
58	Junction plakoglobin OS=Mus musculus GN=Jup PE=1 SV=3	PLAK_MOUSE	82 kDa	2
59	Plectin OS=Mus musculus GN=Plec PE=1 SV=2	PLEC_MOUSE	534 kDa	16
60	mRNA export factor OS=Mus musculus GN=Rae1 PE=1 SV=1	RAE1L_MOUSE	41 kDa	2
61	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Mus musculus GN=Trim21 PE=1 SV=1	RO52_MOUSE	54 kDa	3
62	Reticulon-1 OS=Mus musculus GN=Rtn1 PE=1 SV=1	RTN1_MOUSE	84 kDa	2
63	Secretory carrier-associated membrane protein 5 OS=Mus musculus GN=Scamp5 PE=2 SV=1	SCAM5_MOUSE	26 kDa	2
64	Protein SEC13 homolog OS=Mus musculus GN=Sec13 PE=2 SV=3	SEC13_MOUSE	36 kDa	3
65	Sideroflexin-5 OS=Mus musculus GN=Sfxn5 PE=1 SV=2	SFXN5_MOUSE	37 kDa	2
66	Stomatin-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Stoml2 PE=1 SV=1	STML2_MOUSE	38 kDa	2
67	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit OS=Mus musculus GN=Farsa PE=2 SV=1	SYFA_MOUSE	58 kDa	3
68	Tubulin alpha-1A chain OS=Mus musculus GN=Tuba1a PE=1 SV=1	TBA1A_MOUSE	50 kDa	2
69	Tubulin alpha-1B chain OS=Mus musculus GN=Tuba1b PE=1 SV=2	TBA1B_MOUSE	50 kDa	4
70	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus GN=Tuba4a PE=1 SV=1	TBA4A_MOUSE	50 kDa	26
71	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	TBB2A_MOUSE	50 kDa	8
72	Tubulin beta-3 chain OS=Mus musculus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	TBB3_MOUSE	50 kDa	13
73	Tubulin beta-4A chain OS=Mus musculus GN=Tubb4a PE=1 SV=3	TBB4A_MOUSE	50 kDa	4

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	Anzahl individueller Peptide (Signifikanzfilter > 90 %)
				Sun113
75	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	TBB5_MOUSE	50 kDa	3
76	Tubulin beta-6 chain OS=Mus musculus GN=Tubb6 PE=1 SV=1	TBB6_MOUSE	50 kDa	2
77	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acat1 PE=1 SV=1	THIL_MOUSE	45 kDa	4
78	Transmembrane protein 33 OS=Mus musculus GN=Tmem33 PE=2 SV=1	TMM33_MOUSE	28 kDa	3
79	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS=Mus musculus GN=Thrap3 PE=1 SV=1	TR150_MOUSE	108 kDa	2
80	Short transient receptor potential channel 4 OS=Mus musculus GN=Trpc4 PE=1 SV=1	TRPC4_MOUSE	112 kDa	4
81	Anionic trypsin-2 OS=Mus musculus GN=Prss2 PE=2 SV=1	TRY2_MOUSE	26 kDa	2
82	V-type proton ATPase subunit H OS=Mus musculus GN=Atp6v1h PE=1 SV=1	VATH_MOUSE	56 kDa	3

Tabelle 11: Massenspektrometrische Ergebnisse der IP4 und IP5.

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2 OS=Bos taurus GN=KANK2 PE=2 SV=1	KANK2_BOVIN	92 kDa	1				6		15	
2	Alpha-actinin-4 OS=Bos taurus GN=ACTN4 PE=2 SV=1	ACTN4_BOVIN	105 kDa							24	
3	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	A2MG_HUMAN	163 kDa	0				5	2	6	2
4	Alpha-actinin-1 OS=Bos taurus GN=ACTN1 PE=2 SV=1	ACTN1_BOVIN	103 kDa							14	
5	Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens GN=UBAP2L PE=1 SV=2	UBP2L_HUMAN	115 kDa	4	2		1	2	1	6	3
6	Ig lambda chain C region OS=Orctolagus cuniculus PE=1 SV=2	LAC_RABIT	11 kDa	1	1		1	1	2	1	2
7	Transthyretin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_BOVIN	16 kDa	0	1			4	3	2	4
8	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2	CASA1_BOVIN	25 kDa	0	3			3	2	2	3
9	Vimentin OS=Bos taurus GN=VIM PE=1 SV=3	VIME_BOVIN	54 kDa	1	0				0	5	3

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
10	Liprin-beta-1 OS=Homo sapiens GN=PPFIBP1 PE=1 SV=2	LIPB1_HUMAN	114 kDa					2		4	
11	Myoferlin OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1	MYOF_HUMAN	235 kDa					2		9	
12	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Bos taurus GN=PDIA3 PE=2 SV=1	PDIA3_BOVIN	57 kDa							5	
13	Thioredoxin-1 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=trxA PE=1 SV=2	THIO_ECO57 (+5)	12 kDa							4	2
14	Plectin OS=Homo sapiens GN=PLEC PE=1 SV=3	PLEC_HUMAN	532 kDa	3	2					1	
15	Pyruvate kinase muscle isozyme OS=Gallus gallus GN=PKM2 PE=2 SV=2	KPYK_CHICK	58 kDa							2	
16	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Bos taurus GN=C1QB PE=1 SV=1	C1QB_BOVIN	26 kDa					1	2	2	1
17	Alpha-1-antiproteinase F OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	A1AF_RABIT	46 kDa					2	1	2	2
18	Stromal membrane-associated protein 2 OS=Bos taurus GN=SMAP2 PE=2 SV=1	SMAP2_BOVIN	47 kDa					1	1	4	1
19	Vitronectin OS=Oryctolagus cuniculus GN=VTN PE=1 SV=1	VTNC_RABIT	54 kDa	0				1		4	
20	Epiplakin OS=Homo sapiens GN=EPPK1 PE=1 SV=2	EPIPL_HUMAN	556 kDa	3	3						
21	Histidine-rich glycoprotein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=HRG PE=1 SV=1	HRG_RABIT	59 kDa	0	1			2	1	0	2
22	Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=DPYSL3 PE=1 SV=1	DPYL3_HUMAN	62 kDa							4	
23	Myoferlin OS=Mus musculus GN=Myof PE=1 SV=2	MYOF_MOUSE	233 kDa					2		2	
24	Beta-galactosidase OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=lacZ PE=3 SV=1	BGAL_ECO24 (+5)	116 kDa	2	0			0	0		
25	Profilin-1 OS=Bos taurus GN=PFN1 PE=1 SV=2	PROF1_BOVIN	15 kDa							4	
26	Serpin H1 OS=Bos taurus GN=SERPINH1 PE=2 SV=1	SERPH_BOVIN	47 kDa							3	
27	Leucine zipper protein 1 OS=Homo sapiens GN=LUZP1 PE=1 SV=2	LUZP1_HUMAN	120 kDa					1		2	
28	Actin, muscle-type OS=Molgula oculata PE=3 SV=1	ACT2_MOLOC	42 kDa	0	0					2	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG
29	Complement factor B OS=Bos taurus GN=CFB PE=1 SV=2	CFAB_BOVIN	85 kDa	0			1	2	0	1	1
30	Complement C3 OS=Cavia porcellus GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_CAVPO	186 kDa		0				1		2
31	Serpin A3-5 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-5 PE=3 SV=1	SPA35_BOVIN	46 kDa					0		0	3
32	Junction plakoglobin OS=Bos taurus GN=JUP PE=2 SV=1	PLAK_BOVIN (+4)	82 kDa		2				0	3	
33	Unconventional myosin-Va OS=Homo sapiens GN=MYO5A PE=1 SV=2	MYO5A_HUMAN (+2)	215 kDa	2	1						
34	Tubulin beta-2B chain OS=Bos taurus GN=TUBB2B PE=1 SV=2	TBB2B_BOVIN (+4)	50 kDa		0					2	
35	Annexin A1 OS=Bos taurus GN=ANXA1 PE=2 SV=2	ANXA1_BOVIN	39 kDa							4	
36	Filamin-A OS=Mus musculus GN=Flna PE=1 SV=5	FLNA_MOUSE	281 kDa							2	
37	Supervillin OS=Homo sapiens GN=SVIL PE=1 SV=2	SVIL_HUMAN	248 kDa	2	1						
38	Hemoglobin subunit beta OS=Gorilla gorilla gorilla GN=HBB PE=1 SV=2	HBB_GORGO (+3)	16 kDa					4	1		
39	Collagen alpha-1(XII) chain OS=Homo sapiens GN=COL12A1 PE=1 SV=2	COCA1_HUMAN	333 kDa							6	
40	Moesin OS=Bos taurus GN=MSN PE=2 SV=3	MOES_BOVIN	68 kDa							3	
41	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=GOT2 PE=1 SV=2	AATM_BOVIN (+1)	48 kDa							2	
42	Filamin-B OS=Mus musculus GN=Flnb PE=1 SV=3	FLNB_MOUSE	278 kDa							2	
43	Elongation factor Tu-A OS=Pseudomonas putida (strain KT2440) GN=tufA PE=3 SV=1	EFTU1_PSEPK (+9)	43 kDa	1				2	1		
44	Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	C1R_HUMAN (+2)	80 kDa					2		2	
45	Keratin, type II cuticular Hb1 OS=Bos taurus GN=KRT81 PE=2 SV=1	KRT81_BOVIN	55 kDa	0	3						
46	Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Homo sapiens GN=KRT31 PE=2 SV=3	K1H1_HUMAN (+1)	47 kDa	0	5						
47	Craniofacial development protein 2 OS=Bos taurus GN=CFDP2 PE=1 SV=2	CFDP2_BOVIN	66 kDa							3	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG
48	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=4	K1C13_HUMAN	50 kDa	4	1						
49	Complement C3 alpha chain (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=C3 PE=2 SV=1	CO3_RABIT	82 kDa						2		1
50	Microtubule-associated protein 4 OS=Bos taurus GN=MAP4 PE=1 SV=1	MAP4_BOVIN	112 kDa							3	
51	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Bos taurus GN=UBA1 PE=2 SV=1	UBA1_BOVIN	118 kDa							2	
52	Extended synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens GN=ESYT1 PE=1 SV=1	ESYT1_HUMAN (+3)	123 kDa							2	
53	DNA topoisomerase 1 OS=Chlorocebus aethiops GN=TOP1 PE=2 SV=1	TOP1_CHLAE (+1)	91 kDa					2		0	
54	Collagen alpha-1(III) chain OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1	CO3A1_BOVIN	94 kDa							2	
55	Protein disulfide-isomerase OS=Bos taurus GN=P4HB PE=1 SV=1	PDIA1_BOVIN (+6)	57 kDa							2	
56	Histone H2B 1.2 OS=Xenopus laevis PE=1 SV=2	H2B12_XENLA (+38)	14 kDa	1	3				0		
57	Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERPINB3 PE=1 SV=2	SPB3_HUMAN	45 kDa						1		3
58	Major vault protein OS=Bos taurus GN=MVP PE=2 SV=1	MVP_BOVIN	99 kDa						4		
59	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Bos taurus GN=PDIA4 PE=2 SV=1	PDIA4_BOVIN	73 kDa							3	
60	Glycogen phosphorylase, liver form OS=Bos taurus GN=PYGL PE=2 SV=1	PYGL_BOVIN	97 kDa							3	
61	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	S10A9_HUMAN	13 kDa								2
62	WD repeat-containing protein 1 OS=Bos taurus GN=WDR1 PE=2 SV=3	WDR1_BOVIN	66 kDa							2	
63	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Bos taurus GN=EIF3C PE=2 SV=1	EIF3C_BOVIN (+3)	105 kDa							2	
64	Coatomer subunit gamma OS=Bos taurus GN=COPG PE=1 SV=1	COPG_BOVIN (+3)	97 kDa							2	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
65	Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2	H2A1B_HUMAN (+33)	14 kDa		1				2	1	
66	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	HBA_HUMAN (+2)	15 kDa	0				2	0		
67	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Canis familiaris GN=KRT1 PE=2 SV=1	K2C1_CANFA	64 kDa					3			
68	Fatty acid synthase OS=Bos taurus GN=FASN PE=2 SV=1	FAS_BOVIN	275 kDa							2	
69	Keratin, type I microfibrillar 48 kDa, component 8C-1 OS=Ovis aries PE=1 SV=2	K1M1_SHEEP	47 kDa	1	2						
70	14-3-3 protein sigma OS=Bos taurus GN=SFN PE=2 SV=1	1433S_BOVIN (+3)	28 kDa		2						
71	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Canis familiaris GN=KRT10 PE=2 SV=1	K1C10_CANFA	58 kDa					2			
72	Kappa-casein OS=Bos taurus GN=CSN3 PE=1 SV=1	CASK_BOVIN	21 kDa		2						
73	Calnexin OS=Canis familiaris GN=CANX PE=1 SV=3	CALX_CANFA	68 kDa							2	
74	Collagen alpha-1(III) chain OS=Homo sapiens GN=COL3A1 PE=1 SV=4	CO3A1_HUMAN	139 kDa							2	
75	Transketolase OS=Bos taurus GN=TKT PE=2 SV=1	TKT_BOVIN	68 kDa							2	
76	ADP/ATP translocase 3 OS=Bos taurus GN=SLC25A6 PE=1 SV=3	ADT3_BOVIN (+2)	33 kDa							2	
77	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	CH60_HUMAN	61 kDa							2	
78	Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2	LEG7_HUMAN	15 kDa								2
79	AP-1 complex subunit beta-1 OS=Bos taurus GN=AP2B1 PE=2 SV=1	AP1B1_BOVIN (+7)	106 kDa							2	
80	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Bos taurus GN=DPYSL2 PE=1 SV=1	DPYL2_BOVIN (+2)	62 kDa							2	
81	Major outer membrane lipoprotein OS=Erwinia carotovora subsp. atroseptica GN=lpp PE=3 SV=1	LPP_ERWCT	8 kDa	2							
82	Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=4	IPO5_HUMAN	124 kDa			0				3	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
83	Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1	NUDC_HUMAN	38 kDa	4		0		2		1	
84	Splicing factor 3B subunit 3 OS=Bos taurus GN=SF3B3 PE=2 SV=1	SF3B3_BOVIN (+3)	136 kDa	1		0				3	
85	Alpha-1-antiproteinase OS=Bos taurus GN=SERPINA1 PE=1 SV=1	A1AT_BOVIN	46 kDa			0		1	2	1	2
86	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Bos taurus GN=TRIM21 PE=2 SV=1	RO52_BOVIN	54 kDa	1	1	0	1	8	9	7	7
87	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3	DESP_HUMAN	332 kDa		0	0			0	0	3
88	Serotransferrin OS=Oryctolagus cuniculus GN=TF PE=1 SV=4	TRFE_RABIT	77 kDa	0		0		6	0	2	1
89	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	DCD_HUMAN	11 kDa	1	0	0	0	1	2	2	2
90	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Bos taurus GN=CAP1 PE=2 SV=3	CAP1_BOVIN	51 kDa			0				4	
91	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	VIME_HUMAN	54 kDa	12	10	0	0	0	1	11	9
92	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Bos taurus GN=CAND1 PE=2 SV=1	CAND1_BOVIN (+4)	136 kDa			0				3	
93	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2	K1C17_HUMAN	48 kDa	2	0	0	1	2	6	1	7
94	Liprin-beta-1 OS=Mus musculus GN=Ppfibp1 PE=1 SV=3	LIPB1_MOUSE	109 kDa	0		0		8		17	
95	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=1 SV=3	HNRNPM_HUMAN	78 kDa			0				5	2
96	Ig kappa chain V region 120 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV08_RABIT	11 kDa	2	2	0	2	1	3	3	3
97	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	HNRH1_HUMAN (+4)	49 kDa	1	0	0		0	1	2	2
98	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Bos taurus GN=VCP PE=2 SV=1	TERA_BOVIN (+3)	89 kDa			0				8	
99	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6	HNRPU_HUMAN (+1)	91 kDa			0				2	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG
100	Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL PE=1 SV=4	VINC_HUMAN	124 kDa			0				7	
101	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PIK3R4 PE=1 SV=3	PI3R4_HUMAN	153 kDa	6		0					
102	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4	HSP74_HUMAN (+1)	94 kDa			0				3	
103	Keratin, type I cytoskeletal 28 OS=Mus musculus GN=Krt28 PE=1 SV=1	K1C28_MOUSE	50 kDa	0	1	1	1	1	1	2	1
104	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Bos mutus grunniens GN=LDHA PE=2 SV=3	LDHA_BOSMU (+1)	37 kDa			1				3	
105	YTH domain family protein 3 OS=Homo sapiens GN=YTHDF3 PE=1 SV=1	YTHD3_HUMAN (+2)	64 kDa	1	0	1	0	0	0	3	2
106	Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1	FILA2_HUMAN	248 kDa			1	1	2	2	1	1
107	Ig kappa chain V region K29-213 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV15_RABIT	12 kDa	1	1	1	1	1	2	1	2
108	Ig kappa chain V region AH80-5 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV16_RABIT	12 kDa	1	1	1	1	1	2	1	2
109	Ig heavy chain V-A1 region BS-5 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	HV1A_RABIT	12 kDa	1	1	1	1	1	1	1	2
110	Complement C1q subcomponent subunit C OS=Rattus norvegicus GN=C1qc PE=1 SV=2	C1QC_RAT	26 kDa	1	0	1	1	1	1	2	1
111	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Cricetulus griseus GN=GAPDH PE=2 SV=2	G3P_CRIGR	36 kDa			1				5	2
112	78 kDa glucose-regulated protein OS=Bos taurus GN=HSPA5 PE=2 SV=1	GRP78_BOVIN	72 kDa			1				9	
113	Unconventional myosin-VI OS=Homo sapiens GN=MYO6 PE=1 SV=4	MYO6_HUMAN	150 kDa	2	3	1		0		0	
114	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2	HORN_HUMAN	282 kDa	0	1	1	1	1	1	4	2
115	Tubulin beta-5 chain OS=Gallus gallus PE=3 SV=1	TBB5_CHICK	50 kDa			1				4	0
116	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus GN=Vdac2 PE=1 SV=2	VDAC2_MOUSE (+1)	32 kDa			1				2	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG
117	T-complex protein 1 subunit theta OS=Bos taurus GN=CCT8 PE=1 SV=3	TCPQ_BOVIN	60 kDa			1				2	
118	14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_BOVIN (+6)	28 kDa			1				2	0
119	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2	IMB1_HUMAN (+2)	97 kDa			1				4	
120	Elongation factor 1-gamma OS=Bos taurus GN=EEF1G PE=2 SV=1	EF1G_BOVIN (+1)	50 kDa			1				3	
121	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=HSPA9 PE=2 SV=1	GRP75_BOVIN (+2)	74 kDa			1				4	
122	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	ATPA_HUMAN (+2)	60 kDa			1				4	
123	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Bos taurus GN=CCT6A PE=1 SV=3	TCPZ_BOVIN (+3)	58 kDa			1		0		2	
124	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Bos taurus GN=EIF4A1 PE=2 SV=1	IF4A1_BOVIN (+6)	46 kDa			1				2	
125	Ig kappa-b4 chain C region OS=Orctolagus cuniculus GN=K-BAS PE=4 SV=1	KACB_RABIT	11 kDa	2	2	1	3	2	3	1	3
126	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=HSPD1 PE=1 SV=2	CH60_BOVIN	61 kDa			1				9	
127	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens GN=TRIM21 PE=1 SV=1	RO52_HUMAN	54 kDa	4	3	1	5				
128	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=4	FUBP2_HUMAN	73 kDa	3	2	1	2	1	1	3	1
129	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X PE=1 SV=3	DDX3X_HUMAN	73 kDa	3	0	1	1	1	1	5	8
130	Plastin-3 OS=Bos taurus GN=PLS3 PE=2 SV=1	PLST_BOVIN (+1)	71 kDa			1				2	
131	Endoplasmic reticulum protein OS=Bos taurus GN=HSP90B1 PE=2 SV=1	ENPL_BOVIN	92 kDa			1				17	
132	DNA mismatch repair protein Msh6 OS=Homo sapiens GN=MSH6 PE=1 SV=2	MSH6_HUMAN	153 kDa			2					

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG	bCCE1	rbIgG
133	A-kinase anchor protein 13 OS=Homo sapiens GN=AKAP13 PE=1 SV=2	AKP13_HUMAN	308 kDa	2		2				1	
134	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	PROF1_HUMAN	15 kDa			2					
135	Alpha-2-macroglobulin OS=Bos taurus GN=A2M PE=1 SV=2	A2MG_BOVIN	168 kDa			2		2	1	2	1
136	Protein PRRC2A OS=Homo sapiens GN=PRRC2A PE=1 SV=3	PRC2A_HUMAN (+1)	229 kDa	2		2					
137	Ig kappa chain V region BS-5 OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KV06_RABIT	11 kDa	2	2	2	2	2	3	2	3
138	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	K2C5_HUMAN	62 kDa	3	1	2	3	7	7	9	12
139	6-phosphofruktokinase type C OS=Homo sapiens GN=PFKP PE=1 SV=2	K6PP_HUMAN (+1)	86 kDa			2				1	
140	Myosin-10 OS=Mus musculus GN=Myh10 PE=1 SV=2	MYH10_MOUSE	229 kDa		1	2				1	
141	60S ribosomal protein L12 OS=Bos taurus GN=RPL12 PE=2 SV=1	RL12_BOVIN (+4)	18 kDa	1		2				0	
142	Valine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=VAR5 PE=1 SV=4	SYVC_HUMAN (+1)	140 kDa			2					
143	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4	TCPD_HUMAN (+3)	58 kDa			2					
144	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2	ECHA_HUMAN	83 kDa			2					
145	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens GN=MCM6 PE=1 SV=1	MCM6_HUMAN	93 kDa			2					
146	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Bos taurus GN=MCM3 PE=2 SV=1	MCM3_BOVIN (+3)	91 kDa			2				0	
147	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3	NUCL_HUMAN (+2)	77 kDa			2				4	
148	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Bos taurus GN=PGK1 PE=2 SV=3	PGK1_BOVIN	45 kDa			2				7	
149	Spectrin alpha chain, brain OS=Rattus norvegicus GN=Sptan1 PE=1 SV=2	SPTA2_RAT	285 kDa			2				8	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
150	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	K2C6A_HUMAN	60 kDa	5	7	2	6	3	10	5	15
151	BCL-6 corepressor OS=Homo sapiens GN=BCOR PE=1 SV=1	BCOR_HUMAN	192 kDa	1		2					
152	Ankyrin repeat domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=ANKRD17 PE=1 SV=3	ANR17_HUMAN	274 kDa	1		2		3		11	
153	CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3	PYR1_HUMAN	243 kDa			2					
154	14-3-3 protein theta OS=Bos taurus GN=YWHAQ PE=2 SV=1	1433T_BOVIN (+7)	28 kDa			3					
155	Ig mu chain C region secreted form OS=Oryctolagus cuniculus PE=2 SV=1	IGHM_RABIT	50 kDa	5	2	3	2	10	7	12	9
156	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	G3P_HUMAN	36 kDa			3					1
157	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Homo sapiens GN=NASP PE=1 SV=2	NASP_HUMAN	85 kDa			3					
158	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens GN=KIF5B PE=1 SV=1	KINH_HUMAN	110 kDa			3				0	
159	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	K1C14_HUMAN	52 kDa	2	5	3	4	8	6	8	8
160	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2	FLNB_HUMAN	278 kDa			3				31	
161	Exportin-2 OS=Bos taurus GN=CSE1L PE=2 SV=1	XPO2_BOVIN (+3)	110 kDa			3				1	
162	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	ENOA_HUMAN	47 kDa			3					
163	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Bos taurus GN=HNRNPK PE=2 SV=1	HNRPK_BOVIN	51 kDa			3				7	
164	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=EPRS PE=1 SV=5	SYEP_HUMAN	171 kDa			3				0	
165	Short transient receptor potential channel 4 OS=Bos taurus GN=TRPC4 PE=2 SV=2	TRPC4_BOVIN	112 kDa	4		3		7		21	
166	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2	LDHB_HUMAN (+1)	37 kDa			3				2	
167	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	MDHM_HUMAN (+2)	36 kDa			3				2	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
168	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	ALDOA_HUMAN (+2)	39 kDa			3				2	
169	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=1 SV=3	LPPRC_HUMAN	158 kDa			3					
170	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=1 SV=1	IQGA1_HUMAN	189 kDa			3		1		8	
171	Protein furry homolog-like OS=Homo sapiens GN=FRYL PE=1 SV=2	FRYL_HUMAN	340 kDa	16		3		12		18	
172	Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus GN=TUBB5 PE=2 SV=1	TBB5_BOVIN (+11)	50 kDa	0	0	4		0	1	4	0
173	Ig kappa-b4 chain C region OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	KAC4_RABIT	11 kDa	4	4	4	4	5	5	5	7
174	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	TRYP_PIG	24 kDa	4	4	4	4	4	4	4	4
175	Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	MYH9_HUMAN	227 kDa	1	2	4				3	
176	Serum albumin OS=Oryctolagus cuniculus GN=ALB PE=1 SV=2	ALBU_RABIT	69 kDa	8	3	4	4	20	14	9	12
177	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS=Homo sapiens GN=HUWE1 PE=1 SV=3	HUWE1_HUMAN	482 kDa			4					
178	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	K1C16_HUMAN	51 kDa	6	9	4	9	7	9	9	10
179	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Bos taurus GN=EEF1A1 PE=2 SV=1	EF1A1_BOVIN (+7)	50 kDa	1	1	4	0	4	2	10	0
180	Alpha-enolase OS=Bos taurus GN=ENO1 PE=1 SV=4	ENO1_BOVIN	47 kDa			4				13	
181	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	KCRB_HUMAN	43 kDa			4					
182	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPUL1 PE=1 SV=2	HNRL1_HUMAN	96 kDa	7	6	4	3	4	4	11	12
183	Spectrin beta chain, brain 1 OS=Homo sapiens GN=SPTBN1 PE=1 SV=2	SPTB2_HUMAN	275 kDa			4			1	3	
184	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 PE=1 SV=2	DDX17_HUMAN (+1)	80 kDa			5				0	

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rbIlgG	bCCE1	rbIlgG	bCCE1	rbIlgG	bCCE1	rbIlgG
185	Myosin-10 OS=Bos taurus GN=MYH10 PE=2 SV=2	MYH10_BOVIN	229 kDa	3	2	5				17	1
186	Triosephosphate isomerase OS=Canis familiaris GN=TPI1 PE=1 SV=3	TPIS_CANFA (+4)	27 kDa			5				3	
187	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Bos taurus GN=HSP90AA1 PE=2 SV=3	HS90A_BOVIN (+4)	85 kDa			5			1	5	
188	Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=TRIM28 PE=1 SV=5	TIF1B_HUMAN	89 kDa			5				1	
189	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Homo sapiens GN=PKM2 PE=1 SV=4	KPYM_HUMAN	58 kDa			6				16	
190	Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3	TLN1_HUMAN	270 kDa			6				24	
191	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4	SERA_HUMAN (+2)	57 kDa			6					
192	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3	C1TC_HUMAN	102 kDa			6					
193	Ig gamma chain C region OS=Orctolagus cuniculus PE=1 SV=1	IGHG_RABIT	35 kDa	12	9	7	11	17	14	17	21
194	Actin, cytoplasmic type 5 OS=Gallus gallus PE=3 SV=1	ACT5_CHICK (+31)	42 kDa	11	7	7	0	6	4	12	6
195	Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=CLTC PE=1 SV=5	CLH1_HUMAN (+1)	192 kDa	1	1	7				3	
196	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Rattus norvegicus GN=Hspa1a PE=2 SV=2	HSP71_RAT	70 kDa	3	0	7				7	
197	Tubulin beta-4 chain OS=Xenopus laevis GN=tubb4 PE=2 SV=1	TBB4_XENLA	50 kDa	4	1	8	0	3	1	16	5
198	Tubulin alpha chain OS=Xenopus laevis GN=tuba PE=2 SV=2	TBA_XENLA	50 kDa	0	0	8		2	2	13	4
199	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4	PARP1_HUMAN	113 kDa	13	5	8				1	
200	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=1 SV=2	HSP7C_BOVIN (+6)	71 kDa	3	1	9		1	0	16	0
201	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	DYHC1_HUMAN	532 kDa	0		9				18	0

	Protein (Signifikanzfilter > 95 %)	Accession Nr.	MW	HEKC4				SBAC			
				IP4		IP5		IP4		IP5	
				bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG	bCCE1	rblgG
202	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	K1C9_HUMAN	62 kDa	10	10	10	18	24	23	26	21
203	Myosin-9 OS=Canis familiaris GN=MYH9 PE=2 SV=1	MYH9_CANFA	226 kDa	6	6	10		9	3	40	
204	Elongation factor 2 OS=Bos taurus GN=EEF2 PE=2 SV=3	EF2_BOVIN	95 kDa			10				14	
205	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Equus caballus GN=HSP90AB1 PE=2 SV=3	HS90B_HORSE (+5)	83 kDa			10				18	
206	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 PE=1 SV=3	UBA1_HUMAN	118 kDa			10				3	
207	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PRKDC PE=1 SV=3	PRKDC_HUMAN	469 kDa	14	4	12					
208	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	K1C10_HUMAN	59 kDa	16	15	13	16	26	25	28	27
209	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3	FAS_HUMAN	273 kDa			18					
210	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	K22E_HUMAN	65 kDa	14	18	19	22	25	24	29	24
211	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	K2C1_HUMAN	66 kDa	19	20	23	24	27	29	34	29
212	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	69 kDa	38	35	31	41	51	54	46	62
213	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	FLNA_HUMAN	281 kDa			35				46	

7.4 Sequenzierungsergebnisse

7.4.1 Sequenzierung nach Klonierung der cDNS des mLiprin-beta-1-Proteins

```

ATGATGAGTG ACGCTAGTGA CATGCTGGCC GCGGCGCTGG AGCAGATGGA CGGAATCATA GCAGTTCTA AAGCCTTGGA
GTATTCCAAT GGGATTTTGT ATTGCCAATC TCCCACCTCC CCATTTATGG GAAGCTTGCG CGCTCTGCAC CTGTGGAAAG
ACCTGCGTGG ATTGTTGGAG ATGATGGAAA CGGATGAGAA GGAAGGATTG AGATGCCAGA TCCCAGATTC AACAGCAGAA
GTGCTTATTG AGTGGCTTCA AAATCAAATG ACAAATGGAC ATCTACCTGG GAACGGAGAT GTGTATCAAG AAAGGTTGGC
ACGTCTAGAA AACGACAAGG AATCCCTCGT TCTTCAGGTA AGTGTGTTGA CAGACCAGGT GGAGGCTCAG GGAGAGAAGA
TTCGGGATTT GGAGTTCTGT CTTGAAGAGC ACAGAGAGAA GCTGAATGCC ACTGAAGAAA TGCTGCAGCA GGAGCTTCTG
AGTAGGACTT CTTAGAAAAC ACAGAAGCTG GAGCTGATGG CTGAGATCTC TAACCTGAAG TTAAACTGA CAGCTGTAGA
GAAGGACAGG CTGGATTATG AAGATCGGTT CAGAGACACA GAGGGGCTAA TTCAAGAGAT CAATGATTTG AGGCTAAAAG
TCAATGAAAT GGACGGTGAA AGACTTCAGT ATGAAAAGAA GCTCAAGTCA ACTAAAGACG AATTGGCATC TTTAAAAGAG
CAGCTGGAGG AGAAGGAATG TGAAGTAAAG AGGCTGCAGG AGAGACTGGT TTGTAAGGCG AAAGGAGAAG GGATCGAAGT
CCTCGATCGA GACATTGAAG TACAGAAAAT GAAGAAGGCA GTGGAGTCTC TGATGGCAGC GAATGAAGAA AAGGAGCGGA
AAATAGAAGA CCTGCGGCAG TGCCTGAGCA GGTACAGGAA AATGCAGGAC CCAGCAGTTC TGGCCCAAGG TCAGGATAGT
GAGTGTGAGG GCCTGTTCCCA TTCCAGCTCT ATCTCCACCC TGTTGGATGC ACAGGGCTTT AGTGATCTGG AGAGAAGCAC
TTCTTCTACG CCAGGAATGG GGTCTCCAG CAGGGACCCG CTCCACACGA GTGCTCCAGA AGAGTTTAC ACCAGCGTCT
TGCAAGCTTC AATCCCTCA CTATTGCCAC CATCTGTGGA TGTAGAAACT TGTGAAAAC CCAAGTTGCC TACCAAGCCC
GAGACTTCAT TTGAAGAGGG TGACGGAAGA GCAATCTGG GCGTGCCGC TGAAGTCTCC CTGAGTGATG GTGTTTCAAC
TTCAAGCTG CAGAAATCTA GCAGCCTGG AAATCTGAAG AAAGAGGCAT CGGATGGCAC GGATAAAGCT CCGACTGACA
GCCGACGTT TGGGACCTG CCTCCAAGG TCCCAGGACA CGAAGCCTCT GTGGATGACA ACCCCTTTGG CACTCGCAA
GCCAGGTCCT CATTTGGCCG GGGCTTTTTT AAAATCAAAA GTGGAAAGAG GACAGCAAGT GCACCCAACC TTGCTGAGAC
AGAAAAAGAG ACAGCTGAGC ACCTGAATTT GGCTGGTACA TCTCGGTCAA AAGGTTCCCA GGAACCAAGT CCATCCCAA
TGCTCCACC ATCTCCAGAT TCCAGAAAGA AATCCAGAGG CATCATGAGA CTCTTTGGGA AACTTAGAAG AAGTCAGTCA
ACTACATTCA ACCCAGATGA CATGTCTGAG CCTGAATTCA AAAGAGGAGG GACAAGGGCA ACTGCAGGAC CCAGGCTTGG
TTGGTCTCGA GATTTAGGAC AGTCCAACAG TGACCTGGAT ATGCCATTTG CCAAATGGAC CAAGGAGCAG GTGTGTAGCT
GGCTGGCAGA GCAAGGCTTG GGGTCTTACC TGAGTTCTGG CAAGCACTGG ATTATATCTG GCCAGACGCT TTTGCAGGCT
TCTCAGCAGG ATCTGGAGAA GGAAACTTGGC ATCAAGCATT CACTGCATCG TAAGAAGCTC CAGCTGGCCC TGCAGGCCCT
GGGATCTGAA GAAGAAACCA ACTATGGGAA GCTAGACTTC AACTGGGTTA CTAGATGGCT GGATGATATT GGCCTCCCTC
AGTACAAGAC CCAGTTTGTG GAAGGGCGGG TGGACGGTCG AATGCTGCAC TACATGACTG TGGATGACCT ACTGTCCCTG
AAGGTTGTCA GTGTGCTGCA CCATCTCAGT ATCAAAAGGG CCATCCAAGT GCTGAGGATC AATAACTTTG AGCCAAACTG
TCTAAGGAGG CGGCCGTCTG ATGAGAATAG CATCACCCCA TCTGAGGTTT AGCAGTGGAC CAATCATCGT GTGATGGAGT
GGCTTCGCTC TGTGGACTTG GCAGAATATG CCCCCAATCT CAGAGGCAGT GGTGTCCATG GAGGGCTCAT GGTCTTGGAG
CCTCGTTTTA ATGTAGAAAC TATGGCCAG TTACTGAACA TTCCACCAA TAAAACCTTG TTGCGCAGAC ATTTGGCGAC
CCATTTCAAC CTCTGATTG GTGCAGAGGC CCAGCACCAG AAGCGAGATG CCATGGAGTT ACCGGATTAT GTACTGCTAA
CAGCCACTGC CAAAGTGAAG CCGAAGAAGC TGACCTTTAG CAACTTTGGA AATCTGAGGA AGAAGAAACA TGAAGATGGA
GAGGAATATG TTTGTCCGAT GGAGCTAGGC CAGGCATCAG GTAGCTCCA GAAGGGGTTT AGACCTGGCT TGGACATGCG
CCTGTATGAA GAGGATGATT TGGATCGGTT AGAGCAGATG GAAGATTCAG AAGGGACGGT GAGACAGATA GGTGCATTTT
CTGAAGGCAT CAACAATCTC ACGCACATGC TAAAGGAAGA TGACATGTTT AAGGATTTTG CTGCCCGCTC CCCGAGTGCC
AGCATCACAG ATGAAGACTC CAACGTTTGA

```

7.4.2 Sequenzierung nach Klonierung der cDNS des mFryl-Proteins

ATGTCAAGCA TCACGATTGA CCCGGATGTC AAGCCCGGTG AATATGTCAT CAAGAGTCTC TTTGCAGAAT TTGCTGTTCA
 AGCTGAAAAG AAAATTTGAAG TTGTAATGGC TGAACCCCTG GAAAAGCTGT TATCCAGATC TCTTCAGAGG GGTGAAGATC
 TGCAGTTTGA CCAGTTGGTA AGCTCTATGA GCTCCGTAGC CGAGCACTGT CTCCCCTCCT TACTCCGAAC CCTGTTTGAC
 TGGTACCGAC GCCAGAACGG AACCGACGAT GAATCCTACG GGTACAGGCC TAGGTCGAGC ACAAAGTCTA AGGAGATGA
 GCAGCACCGC GAGAGAGATT ACCTCCTGGA GCGGCGGGAT TTAGCCGTAG ACTTCATTTT CTGTTTAGTT TTGGTAGAAG
 TTCTAAAGCA GATTCTGTG CATCCTGTGC CCGACCCCTT AGTCCATGAG GTTCTAAACC TAGCTTTTAA GCACTTTAAA
 CACAAGGAAG GATATTCAGG GACCAACACG GGAACGTGC ATATCATTGC GGATTTATAT GCAGAGGTGA TTGGCGTGCT
 TGCCAGTCA AAGTTCAGG CTGTGAGGAA GAAGTTCGTG ACTGAGCTGA AAGAGCTGCG GCAGAAGGAG CAGAGCCCAC
 ACGTGGTCCA GAGCGTCATC AGCTTGATCA TGGGGATGAA GTTCTTCCGA GTGAAGATGT ATCCCGTGA AGATTTGAA
 GCATCCTTTC AGTTCATGCA GGAATGCGCT CAGTATTTCT TAGAAGTAAA AGATAAGGAC ATAAAGCACG CACTTGCTGG
 TTTATTCTGTG GAGATCCTTA TCCCCTAGC CGCTGCTGTT AAAAAAGAAG TCAATGTCCC CTGTTTAAA AATTTTGTGG
 AGATGCTGTA TCAGACTACA TTTGAACTTA GTTCCAGAAA GAAGCATTTC CTGGCTTTGT ACCCACTAAT TACCTGTCTT
 TTATGTGTC GTCAGAAAACA GTTTTTTTTA AATAACTGGC ATATTTTCCCT ACAAACACTGT TTGTACATT TAAAGAATAA
 AGACCCTAAA ATGTCTCGAG TTGCACTGGA GTCTTTGTAT AGGCTGTTGT GGGTTTATGT AATTAGGATA AAGTGTGAGA
 GCAATACTGT AACGCAAAGT CGCCTGATGA GCATAGTGTC TGCTCTTTTC CCAAAGGGCT CCCGCACTGT GGTCCCCCGT
 GACACCCCTC TCAATATATT TGTGAAGATC ATCCAGTTCA TTGCTCAGGA ACGTTTGGAT TTTGCAATGA AAGAAATAAT
 ATTTGATCTT CTCAGTGTTG GAAAGTCTAC AAAAACTTC ACCATTAATC CAGAGAGGAT GAACATTGGC CTGCGAGTCT
 TCCTCGTCAT CGCGGACAGC CTGCAGCAGA AGGATGGAGA CCCTCCCATG CCCACCACAG GAGTCATTCT TCCTCAGGA
 AACACTCTC GTGTGAAGAA GATTTTCTC AATAAACCT TGACAGACGA AGAGGCCAAA GTCATAGGAA TGTCGGTTTA
 CTATCCTCAA GTAAGAAAAG CATTAGACAG CATTCTCCGA CATTGGACA AAGAGTTGG GAGACCAATG TGTATGACCA
 GTGTGCAGAT GTCCAACAAA GAGCCTGAAG ACATGATTAC GGGGAAAAGA AAACCCAAA TCGATTTGTT TAGAACCTGC
 ATTGCTGCAA TTCCAAGGTT GATTCCCGAT GGTATGAGCA GAACGGACCT CATTGAGCTG TTAGCAAGGC TCACAATCCA
 CATGGATGAA GAACTGCGGG CGCTGGCCTT CAACACCCTG CAGGCTCTGA TGCTTGATTT CCCAGACTGG CGCGAGGATG
 TGCTTTCAGG CTTTGTATAT TTTATCGTTC GTGAAGTGAC TGATGTCCAC CCCACCCTC TTGATAACGC TGTAAGATG
 TTGGTACAAT TAATAAATCA ATGGAACAG GCAGCTCAGA TGTACAACAG GACCCAGGAC TCCCAGCACG GCATTGTCAA
 TGAGAGCCCT CACCCCCCTC CTCTGGAAAG GAACCATAT TCCACTGTGT TCCATGTGGTCAAGGCTTTG CCCTGGTCAT
 CCTCTGTAGC AGTCGGCCTG CCACGAGAAG ACTGGCAGTC AGCGTCTTC GAGAGATACG GGCTTTATTT GCACTTTTGG
 AGGTACCTAA GGGTGATGAT GAGTTAGCCA TAGATGTGAT GGACAGACTG AGCCCATCCA TTCTGGAGAG CTTTATCCAC
 CTCACGGGG CCGATCAGAC TACTTTGCTG TATTGGCCTA GCTCTGTAGA TCTGCAGACA TTAGCAGATT GGAACCTTC
 TCCATCAGC CACCAGTTG ATGTGATCAG CCCCTCACAC ATTTGGATAT TTGCACATGT GACCCAAGGC CAAGACCCAT
 GGATTATAAG TCTCTCCAGT TTCCTAAAGC AAGAAAACCT TCCCAAACAC TGCTCTACAG CCGTGAGCTA TGCGTGGATG
 TTCGCATACA CCAGGCTGCA GCTCTTGTC CCCAGGTGG ATATAAATAG CCCCATCAAT GCTAAGAAAAG TAAATGCCAC
 CACGAGCAGC GACTCGTACA TTGGCCTGTG GAGAACTAC CTGGTCTCT GCTGCAGCGC AGCCACCTCC CCGTCCCCAT
 CAGCACCCGC AGGCTCCGTG AGATGTCTC CTCCCAGAC GCTGGCGTCC ACCCCTGACA GTGGCTACAG CATCGATTC
 AAGATCGTTG GCATCCCGTC CCCTTCTTCC CTGTTTAAAG ACATAGTTC AATGATGCGC TCTGAGAGCA TGGAGATCAC
 AGAGTCCCTC GTTCTAGGCC TCGGCAGGAC CAACCCGGGA GTCTTTAGAG AATTAATAGA GGAGTTGCAT CCCATCATTA
 AAGAAGCACT TGAAAGAAG CCAGAGAATA TGAAACGGCG CAGGCGTCA GACATTTTAC GAGTACAGCT GGTACGGATA
 TTTGAGCTGT TGGCGGATG TGGTGTCAAT AGCCACAGTG CAAGCGCGG CCTTGATAGC GAAACTCACT TCCTCAACAA
 CACTCTCTT GAGTACGTG ACTTAAACGG ACAACTTCTG GAAGCAGAAA ACGAGAAGGA CTCCGACACC CTGAAGGATA
 TCCGATGCCA TTTCAGTGC TTAGTGGCGA ATATCATTCA GAATGTTCG GTGCACCAGA GGAGAAGCAT CTTTCCCAG
 CAGAGCCTGC GTCACAGCCT GTTCATGTTG TTCAGCCACT GGGCGGGCCC CTTTAGCATC ATGTTACGC CCCTGGACAG
 ATACAGTGAC AGGAATATGC AGATCAACAG ACACCAGTAC TGTGCGTTAA AGGCTATGTC TGCTGTACTG TGTGTGGCC
 CTGTTGCAGA TAATGTGGGA CTGTATCAG ATGGCTATTT GTACAAATGG CTGGATAACA TTTTGGACTC TCTGGATAAA
 AAGGTTCAAC AGTTGGGCTG TGAAGCAGTC ACGTTGTGTC TGGAGCTGAA CCCTGATCAG AGCAGCCTGA TGTACTGGGC
 CGTGGACCGA TGCTACACCG GCTCCCGGAG AGTAGCAGCC GGCTGCTTCA AAGCCATTGC CAACGTGTTT CAGAACAGGG
 ATTACCAGTG TGACACAGTG ATGCTCCTAA ACCTGATACT GTTTAAAGCA GCTGACTCTT CTAGAAGTAT CTATGAAGTT
 GCTATGCAAC TCTTGAGAT CCTGGAGCCG AAGATGTTTC GCTATGCTCA CAACTGGAG GTTCAGAGAA CGGATGGAGT
 CCTCAGTCAG CTGTCCCGC TGCCACATCT CTATTCTGTG TCTTATTACC AGTTGTCTGA GGAGCTAGCC CGAGCATATC
 CAGAGCTCAC TCTCGCCATA TTCTCAGAGA TCAGCCAGCG GATCCAGACG GCACACCCCG CGGGCGGCA GGCCATGCTT

CATTACCTAC TGCCCTGGAT GAACAACATC GAGCTGGTCG ACCTCAAACC TCTGCCTTCA GGGAGGCGGC AGGATGAAGA
 TGAAGATGAC TCCTTGAAG ACCGAGAGCT CATGGTGACC AGCAGGCGCT GGCTGAGAGG AGAAGGCTGG GGCTCCCCAC
 AGGCCACCGC CATGGTGTTG AACAACTCTCA TGTACATGAC AGCGAAGTAC GCGGATGAGC TGGCCTGGTC GGAGGTGGAG
 AATGTGTGGA CCACCCTTG AGACGGCTGG CCAAAGAACC TGAAAATTAT TTTGCACTTT CTGATCAGCA TCTGCGGAGT
 GAATAGCGAA CCAAGCCTCT TGCCTTACGT GAAGAAAGTC ATCGTCTACC TGGGTCGAGA CAAAACCATG CAGCTGTCTGG
 AAGAGCTGGT GAGCGAGCTG CAGCTCACGG ACCCCGTCAG TTCCGGCGTC ACGCACATGG ATAACCCGCC CTACTACCGC
 ATCACTTCCA GCTGTAAAAT CCCTTCCGTC ACCTCAGGAA CTACTTCCAG TAGCAATACA ATGGTTCGTC CCACAGATGG
 CAACCCTGAC AGTAAGGTC TAAAGGAGAA CTTTGAAGAG AGCTATGTGC ACCTGGACAT CTACGGGGGA CTGAACAGTC
 ATTTAAACCG GCAACACCAC AGACTGGAGT CCCGATACAG TAGCAGCTCC GGAGGGTCTT ACGAAGAGGA GAAAAGTGAC
 TCAATGCCAC TTTATTCTAA TTGGCGCTG AAAGTGATGG AGCACAACCA AGGAGAGCCA CTGCCCTTCC CGCCAGCTGG
 AGGCTGTCTG TCGCCACTGG TGGATTACGT GCCTGAAACA GCATCTCTG GATTGCCTCT ACACAGGTGT AACATAGCCG
 TGATCCTGCT GACAGATCTG ATCATTGACC ACAGCGTGAA GGTGGAATGG GGAAGTTACC TCCACCTGCT GCTTCATGCA
 ATTTTTATAG GGTTTGATCA CTGCCACCCT GAGGTGTACG AGCACTGCAA GCGCCTGCTG CTGCACTTAC TGATAGTGAT
 GGGACCCAAC AGTGACATCC GGACTGTCCG CTCTGTCCCT CTCAGGGACA AGGAATTCAA TGAGCCCAGG GTGTTGACAG
 TCAAGCAGAC GGCACACTCA GATTACACGT TCACAGCAGG CATTAAACGAT TTTACACCCG ATTACCAGCC GTCCCCATG
 ACCGACTCAG GGCTTAGCTC CAGTTCTACC TCCTCTAGTA TCAGCTTAGG AAACAACAGC GCTGCCATTT CACACCTCCA
 CACCACCCTC CTCGGCGAGG TGGACCTCTC AGTGGAGCAG GATGAAAAAG TCAAACCCCT CATGGAGTTC ATTACCTCAA
 GAAAACGAGG GCCCCTTTGG AACCATGAGG ACGTTTCTTC CAAGAACCCT AGCATCAAGA GTGCTGATCA GCTCGCCACG
 TTCCTGAAGC ACGTGGTTTC TGTCTTCAAG CAGTCAAATG CAGAAGGAAT ACACTTGAGG CGTCATCTCA GCGAGGTGGC
 CCTGCAGACG GCCCTTTCGT GTTCTTCCCG ACACTATGCT GGGCGATCCT TCCAGATTTT CAGGGCACTG AAGCAGCCCC
 TGCTGACAGA CACACTCTCC GATGTCTCTC CCCGGCTGGT GGAGACTGTA GGGGACCCCG GAGAGGATGC ACAGGGATTT
 GTGATTGAAC TGCTTCTCAC CTTGGAATCT GCAATTGATA CCTTGGCTGA AACCATGAAG CACTATGACC TGCTGTCTGC
 CCTCTCTCAA TCCTCATACC ACGATCCTGT CATGGGAAAC AAGTATGCAG CTAACAGGAA AAGCACTGGC CAGCTCAATC
 TAAGCACAAG TCCCATTAA AGCAGCGGCC ATTTGGGATG CAACGGGGAC ACAAGAAGTA ACTCTTTGAG GTAAGTCTA
 GTTGGTGACC GCAGAGGTGA CCGGCGGCGG AGTAACACAC TGGACATAAC GGATGGACGG ATAACCACA GTGGTAGCTT
 GGCGAGGACT CGAAGCCTTT CCTCGCTGAG AGAGAAAGGT GTGTACGACA CGCAGCCCCG GACGGAGCCG AGCAACCTGA
 TGGCCACCAT CTTTTGGATA GCAACGCTC TGTTAGAATC CGACTATGAA TATGAATACC TCCTGGCTCT CAGGCTTCTG
 AGCAAATGC TCACCCACTT GCCTCTGGAT AAGTCAGAGA GCCGGGAGAA GATCGAGAAC GTACAGAGCA AGTTGAAATG
 GAGTAACTTC CCCGGCCTTC AGCAGCTCTT CCTTAAGGGG TTTACCTCAG TGTCTACCCA AGAGATGACC GTGCACCTCC
 TCAGTCAGCT CATTTCCGTC TCCAAACACA CACTGGTGGA TCCGTCCCAG GTGTCAGGCT TTCCTCTTAA CATCCTCTGC
 TTACTGCCTC ACCTAATCCA GCATTTTGAC AGCCCAACTC AGTTTTGCAA AGAGACAGCT AGCCGGATAG CAAAGGTCTG
 TGCGGAAGAG AAGTGCCCGA CGCTGGTGAA CCTGGCTCAC ATGATGAGTT TGTACAGCAC ACATACCTAC TCCAGAGACT
 GTTCCAAC TGATCAACGTG GTGTGCCGGT ACCTGCACGA CTCTTCTCA GAGGCGACCT TCAGTCTTGT GACTTACCTG
 GCAGAGCTGT TAGAAAAGG ACTGTCCAGC ATGCAGCAGT CGTTGTCTACA GATCATCTAC AGTCTGTTGA GTCACATCGA
 CTTGTCTGCG GCCCCGTC AGCAGTTTAA TCTGGAGATC ATAAAGATCA TTGGCAAATA CGTACAGAGC CCGTACTGGA
 AGGAAGCCCT CAACATCTG AAGCTGGTGG TGTCCGCTC TGCAAGTCTT GTCGTCCCCA ATGACATCCC CAAGGCCCTAC
 GGAGTGGACG TAGGCTCTCC CGAAATCTCC TTCGTAAAAA TTTTCAATAA CGTCTCGAAG GAGCTGCCCG GCAAGACCTT
 AGATTTTAC TTTGACATCT CTGAGACACC TATCATTTGG AACAAAGTATG GAGGCCAACA CAGTGCCCGG GGAAGGAATG
 GGAAGGAAA GGTGATCGCA GTCACCAGGA GCACGTCCCT CACCTCCTCT GGCTCCACAT CCAACGCCCT AGTTCTCTGTC
 AGCTGGAAAA GGCCACAGTT ATCACAGCGG AGAACGAGAG AGAAGCTGAT GAGCGTGCTT TCCCTCTGTG GCCCGAATC
 TGGCCTCCCC AAGAATCCCT CCGTTGTGTT TTCTTCAAAT GAGGATTTGG AAGTCGGGA CCAACAGACC AGCTTGATCT
 CCACCACCGA GGACATAAAT CAAGAAGAAG AAGTTGCCGT CGAAGACAAC AGCAGTGAGC AGCAGTTTGG CGTCTTCAAG
 GACTTCGACT TCTTGGATGT TGAATTGGAG GATGCAGAGG GGGAGAGCAT GGACAATTTT AACTGGGGAG TCCCGCGCG
 CTCGCTGGAC AGCATTGACA AAGGAGACAC ACCATCCCTC CAGGAGTACC CGTGTTCAG CAGCACCCCC AGCCTGACCC
 TGACGAACCA GGAGGATACC GACGAGTCCT CAGAGGAAGA AGCCGCCCTC ACCGCAAGCC AGATCCTGTC ACGCACCCAG
 ATGCTGAACA GTGACTGTGT GACGGAGGAC ATGATGCCCG AGCACCAGGA CCTGCTGCAG TCTCAGGATT CTGCTAGCAG
 CAACACGACA GAAGACGTAC TGCAGATCAG AGACGAGACC CCCAGTTTGG AGGCCTGTCT AGATAATGCT AGCAGCCAGC
 TGCTGAGGG TACAAGTTCA GTATTAAGG AGGAACACGT TACAGCCTTT GAAGACGAAG GGTACATAGT TATTCCAGAC
 CAACAGGACC CGCTAGTATG TCGAGGGATT CTTGATTTAG AGGAACTGA CATGCCAGAG CCTCTGGCCC CTGAAAGCTA
 CCCCAGTCC ATCTGTGAAG AGGATGTCAC CTTGGCTTTG AAAGAGCTGG ATGAACGGTG TGAGGAGGAA GAGGCTGACT
 TCTCAGGGTT GTCCAGTCAA GAGGAAGATG AACAAAGACGG CTTTCCAGAA GTGCAAACCT CGCCTCTCCC GACCCCTTT

CTGTCTGCCA TAATAGCAGC TTTCCAGCCA ATGGCTTACG AGGACGAGGA AGAAGCGTGG CGTTGCCATG TCAATCAGAC
GCTGTCGGAC ACAGACGGGT CCTGTGCGGT GTTTACTTTC CACGTGTTTT CAAGACTGTT TCAGACAATT CAAAGGAAGT
TTGGAGAGAT AACGAAGGAG GCTGTGGGCT TTCTTGGTGA GAGTCTACAG CGCATTGGTA CCAAGTTTAA AAGCTCATTG
GAAGTGATGA TGGCCTGTTC TGAATGCCCC ACTGTCTTTG TGGATGCCGA AACGCTGATG GCGTGTGGCT TGCTGGAAAC
ACTCAAGTTT GGCGTCTTGG AGCTGCAGGA ACATCTGGAT ACTTACACCA CCAAGAGAGA AGCAGCCGAG CAGTGGCTAG
ACAACTGCAA GAGGACATTC GGTGCCAACG AAGACATATA CAGGATGAAC ACCAACGCGC ATGAGCTGGA GCTCTGCAGA
AGGTTGTACC GGCTGCACTT TCAGCTGCTG CTTCTGTTCC AGGCCTACTG CAAACTCATC AACCAAGTAA ATACCATCAA
GAATGAAGCA GAGGTATCA ACATGTCAGA AGAACTTGCC CAGCTGGAAG GCATCCTTAA GGAAGCTGAG GCCGCTTCGG
AAAATGAAGA AATTGATATC TCCAAAGCGG CCCAGACCAC GATAGAAACT GCCATTCCT CTCTGATCGA AACCTTGAAG
AACAAGGAAT TTGTATCAGC TGTGGCACAA GTCAAAGCTT TCAGAACCCT CTGGCCCAAT GACATCTTCG GCAGCTGTGA
TGACGACCCT GTGCAGACTC TCTTACACAT CTATTTCCAT CACCAGACAC TAGGCCAGAC AGGCAGCTTC GCGGTCATCA
GCTCAAACCT GGACATGTCA GAAGCTAACT GCAAACCTGAT GGAACCTAAC CTGGAGATCA GAGAGTCTCT CCGCACAGTG
CAGTCATATC CGCTCCTAGC ACAGACCAAA CCAGTTGGAA ATATGACGAG CACTGGATTC TGA

7.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi, Leiter des Instituts für klinische und experimentelle Pharmakologie der Universität des Saarlandes, für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion in seinem Institut durchzuführen. Vielen Dank für die interessante Aufgabenstellung und für die wegweisende Leitung während meiner Arbeit.

Frau Dr.-Ing. Claudia Fecher-Trost danke ich für die gute Betreuung. Ohne die zahlreichen Hinweise, Diskussionen und Hilfestellungen bei Problemen wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit fertigzustellen.

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. Pascal Schalkowsky. Die erhaltenen Ergebnisse waren ein wesentlicher Bestandteil meiner Arbeit.

PD Dr. Ulrich Wissenbach und Karin Wolske möchte ich für die Hilfe und Unterstützung bei allen molekularbiologischen Experimenten danken, Lorenz Latta für die Hilfe bei den FURA-Experimenten. Heidi Löhr danke ich für die zahlreichen und mühseligen Arbeiten in der Zellkultur.

Martin Simon-Thomas und Kathrin Schetting danke ich für die technische Unterstützung. Bei den Sekretärinnen Frau Claudia Ecker, Frau Christa Seelinger und Frau Elisabeth Kitzing möchte ich mich für jegliche Art der Organisation bedanken.

Mein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie. Sie alle haben mich auf unterschiedliche Art und Weise auf meinem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt und dafür gesorgt, dass ich stets gerne ein Mitglied der "Pharma-Familie" war: Dr. Janka Dörr, Dr. Pascal Schalkowsky, Jasmin Zimmermann, Julia Meiser, Dr. Christof Störger, Lorenz Latta, PD Dr. Ulrich Wissenbach, Dr. Andreas Beck, PD Dr. Stephan Phillip, Lisa Roth, Sandra Plant, Christine Wesely, Kerstin Fischer, Karin Wolske, Ute Soltek, Igor Gamayun, Sandeep Dembla, Anouar und Thabet Belkacemi, Katja Frohnweiler, Nouma Hasan, Anna Dembek, Victoria Bagda, Beate Czepukojc.

Zuletzt möchte ich ein großes Dankeschön an alle richten, die mich außerhalb des Labors unterstützt haben. Besonders dankbar bin ich meinen Freunden und meiner Familie, meinen Eltern Christoph und Bettina Meiser, meinen drei Geschwistern Philip, Isabel und Clemens Meiser und meinen Großeltern. Danke, dass ihr mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet und unterstützt habt.

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Franziska Meiser
Geburtsort: Soltau
Geburtsdatum: 01.09.1987
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1995-1998 Grundschule Visselhövede
1998-1999 Grundschule Körprich
1999-2007 Johannes-Kepler-Gymnasium Lebach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Seit 10/2007 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
09/2009: 1. Staatsexamen
Seit 09/2009 Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes
Seit 10/2009 Promotion bei Prof. Dr. Flockerzi am Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des
Saarlandes in Homburg