

Untersuchung des TRPV5 Kalziumkanals und daran assoziierter Proteine mittels Affinitätschromatographien

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Janka Dörr

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. 08. 2010

Promotionskommission: Vorsitzender: Prof. Dr. M. Hahn
Referentin: Jun. Prof. Dr. C. Fecher-Trost
Koreferent: Prof. Dr. E. Friauf

Kaiserslautern, Juni 2010

D386

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Kaiserslautern, 11.Juni 2010

Janka Dörr

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kalziumtransport in Epithelien	1
1.2	Kalziumtransportierende Gewebe – Niere und Plazenta	2
1.2.1	Kalziumtransport in der Niere.....	2
1.2.2	Kalziumtransport in der Plazenta	3
1.3	Die TRP-Superfamilie	5
1.4	Die TRPV-Familie	7
1.5	Der epitheliale Kalziumkanal TRPV5	7
1.5.1	Strukturelle und funktionelle Charakteristika des TRPV5-Proteins.....	8
1.5.2	Regulation von TRPV5	10
1.5.2.1	Regulation durch Hormone	10
1.5.2.2	Regulation durch Ionen	12
1.5.2.3	Regulation durch Interaktionspartner	13
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	MATERIAL	17
2.1	Laborgeräte.....	17
2.2	Materialien und Chemikalien.....	18
2.3	Puffer und Lösungen.....	20
2.4	DNA- und Proteinmarker	24
2.5	Verwendete Antikörper	24
2.5.1	Primärantikörper	24
2.5.2	Sekundärantikörper	25
2.6	DNA-Vektoren	26
2.7	Kompetente Bakterienstämme	26
2.8	Klonierungsprimer	27
3	METHODEN	28
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
3.1.2	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	29
3.1.3	Herstellung von Agar-Selektionsplatten	30

3.1.4	Restriktionsverdau von Plasmiden	30
3.1.5	DNA-Ligationen	31
3.1.5.1	Ligation von PCR Produkten mit dem Vektor pJET ("Blunt-end"-Ligation)	31
3.1.5.2	Ligation mit dem Vektor pGEX ("sticky-end"-Ligation)	32
3.1.6	Transformation.....	32
3.1.7	Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	33
3.1.8	Quantitative Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	34
3.1.9	Horizontale DNA-Agarosegelelektrophorese	34
3.1.10	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	35
3.1.11	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
3.1.12	Sequenzierung von DNA	35
3.1.13	Anlegen von Glycerindauerstocks	35
3.2	Expression und Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen.....	36
3.2.1	Expression der GST-Fusionsproteine in <i>E.coli</i>	36
3.2.2	Isolation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien.....	37
3.3	Proteinbiochemische Methoden	38
3.3.1	Mikrosomenpräparationen	38
3.3.1.1	Mikrosomenpräparation aus humaner Plazenta	38
3.3.1.2	Mikrosomenpräparation aus Rattengeweben.....	39
3.3.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Maus-Niere.....	39
3.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach der BCA-Methode	40
3.3.4	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	40
3.3.5	Solubilisierung von Membranproteinen mit verschiedenen Detergenzien.	40
3.3.6	Immunpräzipitation mittels Protein A- bzw. G-Agarose.....	42
3.3.7	Herstellung und Anwendung von Antikörper-Affinitätsäulen.....	43
3.3.7.1	Kovalente Kopplung an AminoLink-Agarose	43
3.3.7.2	Kovalente Kopplung an Protein A/G Agarose.....	44
3.3.7.3	Antikörper-Affinitätschromatographie	44
3.3.8	Deglykosylierung von TRPV5 aus transfizierten COS-Zellen.....	45
3.3.9	Proteingele	46
3.3.9.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	46
3.3.9.2	Herstellung von linearen Gradientengelen	47
3.3.9.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.3.10	Färbung von Proteingelen	48
3.3.10.1	Coomassie-Blau-Färbung	48
3.3.10.2	"Blue-Silver"-Färbung.....	49
3.3.11	Western-Blot-Analyse.....	49
3.3.11.1	Western Blot.....	49
3.3.11.2	Immunfärbung im Western Blot.....	50
3.3.11.3	Entfernen von Antikörpern von der Nitrocellulose-Membran.....	50
3.4	TRPV5 Antikörper-Generierung und –Charakterisierung	51
3.4.1	Auswahl der Peptidsequenzen zur Antikörper-Generierung	51
3.4.2	ELISA zum Austesten der Antikörperseren	52
3.4.3	TRPV5-Peptidblots	53

3.4.3.1	Antikörper-Inkubation auf Peptidblots	53
3.4.3.2	Regeneration von Peptidblots	53
3.4.4	Herstellung einer Peptid-Affinitätssäule mit NHS-Sepharose.....	54
3.4.5	Isolierung von Antikörpern aus Kaninchenseren über eine Peptidsäule.....	54
3.5	Indirekte Immunhistochemie mit humanen Plazentaschnitten	55
3.5.1	Gewebevorbereitung	55
3.5.2	Anfertigung und Fixierung von Kryoschnitten	55
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung und Detektion.....	56
3.6	Pulldown mit GST-Fusionsproteinen	56
3.7	Massenspektrometische Analyse von Proteinen	57
3.7.1	Vorbereitung von Proteinbanden für die Massenspektrometrie	58
3.7.2	Tryptischer Verdau der Proteine im Gel	59
3.7.3	Extraktion von Peptiden aus den Gelbanden.....	59
3.7.4	ESI-massenspektrometrische Analyse der extrahierten Peptide.....	59
3.7.5	Auswertung der massenspektrometrischen Daten.....	61
4	ERGEBNISSE	62
4.1	Klonierung von GST-TRPV5 Fusionsproteinen.....	62
4.1.1	Klonierungsstrategie	64
4.1.2	Expression und Aufreinigung der GST-TRPV5 Fusionsproteine	66
4.2	TRPV5-Antikörper.....	69
4.2.1	Auswahl von antigenen Peptiden.....	70
4.2.2	Durchführung von ELISA-Tests	71
4.2.2.1	ELISA mit den 982-Seren	72
4.2.3	Charakterisierung der Antikörperseren 982/3 durch Western Blot-Analysen	73
4.2.4	Epitop-Bestimmung von Antikörper 982 und Alomone mit Peptidblots	76
4.2.5	Nachweis von TRPV5 in verschiedenen Geweben	77
4.2.6	Validierung der vier TRPV5 Antikörper mittels Western Blot Analyse	79
4.2.7	Antikörper-Validierung mittels Immunhistochemie	83
4.3	Immunpräzipitationen zur Anreicherung von TRPV5 aus humaner Plazenta....	88
4.3.1	Immunpräzipitationen mit RIPA als Solubilisierungspuffer	88
4.3.2	Austesten verschiedener Detergenzien für die Immunpräzipitation von TRPV5	90
4.3.3	Immunpräzipitationen mit Triton X-100 als Detergenz zur Solubilisierung	94
4.3.4	Deglykosylierung von TRPV5.....	95
4.3.5	Immunpräzipitation aus Maus-Nierengewebe.....	96
4.3.6	Immunpräzipitationen mit weiteren TRPV5 Antikörpern	97
4.3.7	Immunpräzipitation zum massenspektrometrischen Nachweis von TRPV5	99
4.4	Antikörper-Affinitätschromatographie mit TRPV5	101
4.4.1	Vergleich der kovalenten Kopplung von TRPV5 Antikörpern an Protein A- oder AminoLink-Agarose	102

4.4.2	Antikörper-Affinitätsreinigung von TRPV5	104
4.5	Pulldown-Experimente mit den TRPV5 Fusionsproteinen N7 und C4.....	105
4.5.1	GST-TRPV5 Pulldown-Experimente mit humaner Plazenta und anschließender massenspektrometrischer Analyse	105
4.5.2	Western-Blot Analyse der im Pulldown gefundenen putativen TRPV5 Interaktionspartner	116
5	DISKUSSION	118
5.1	Beurteilung der Expression und Reinigung der GST-TRPV5 Fusionsproteine.	118
5.2	Validierung der Spezifität und Affinität von polyklonalen TRPV5 Antikörpern unter Verwendung verschiedener biochemischer Nachweisverfahren	119
5.2.1	Die Spezifität des TRPV5 Antikörper 982/3 und der Vergleich mit einem kommerziellen TRPV5 Antikörper.....	120
5.2.2	Die vier TRPV5-Antikörper detektieren spezifisch das humane TRPV5 Protein	121
5.2.3	Untersuchung der TRPV5 Expression in Maus-Niere und humaner Plazenta sowie Hypothesen zur möglichen Funktionsrelevanz in der Plazenta	124
5.3	Vergleichende Betrachtung der Identifikation von TRPV5 interagierenden Proteinen mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und Pulldown-Assays.....	128
5.3.1	Die Eignung von Triton X-100 zur Solubilisierung von TRPV5 Proteinen	128
5.3.2	Immunpräzipitation mit TRPV5 Antikörpern	129
5.3.3	Affinitätsreinigung von TRPV5 aus der Plazenta und massenspektrometrische Analyse	131
5.3.4	Pulldown-Assays zur massenspektrometrischen und Western Blot Analyse	135
5.3.5	11 β -HSD2	140
5.3.6	Ku70	142
5.3.7	Calpain-6.....	143
6	ZUSAMMENFASSUNG	146
7	LITERATURVERZEICHNIS	147
8	ANHANG	162
8.1	Abkürzungsverzeichnis	162
8.2	Ergebnislisten und Abbildungen zur ESI-massenspektrometrischen Analyse ..	164
8.3	Veröffentlichungen	188
LEBENS LAUF	189	
DANKSAGUNG	190	

1 Einleitung

1.1 Kalziumtransport in Epithelien

Epithelzellen bilden nicht nur die äußere Grenzschicht des Körpers (Hautepithel), sondern sie kleiden auch alle inneren Hohlräume aus. In dieser kontinuierlichen Zellschicht, die je nach Funktion unterschiedliche Formen besitzen kann, sind aneinandergrenzende Zellen an den lateralen Seiten durch so genannte "tight junctions" (Zonulae occludentes) verknüpft. Der Raum zwischen benachbarten Zellen wird dadurch abgedichtet und dient so als Barriere für wasserlösliche Moleküle. Gleichzeitig bilden die tight junctions die Voraussetzung für die Polarisierung der Epithelzellen in einen apikalen und basalen Bereich [Alberts et al., 2001]. Bei der Auskleidung von Hohlräumen zeigt die apikale Seite jeweils zum Lumen hin, der basale und laterale Pol ist der extrazellulären Flüssigkeit zugewandt. Neben der eigentlichen Barrierefunktion können Epithelzellen aber auch bei der Sekretion oder an Transportprozessen wie der Nährstoff- und Ionenaufnahme beteiligt sein [Alberts et al., 2001; Andrade et al., 2007]. Ein gerichteter Transport ist auf diese bipolare Struktur der Zelle angewiesen, mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung, speziell der Transportproteine (z.B. Ionenkanäle), in der apikalen und basolateralen Membran. Kalzium, ein Molekül das über Epithelien transportiert wird, ist das häufigste Kation im menschlichen Körper [Peng et al., 2003] und essentiell in allen Organismen, wo es an zahlreichen strukturellen und funktionellen Prozessen beteiligt ist [Khanal et al., 2008]. Die ionische Form, Ca^{2+} , dient als universeller Botenstoff und Kofaktor für Proteine und Enzyme zur Regulation wichtiger biologischer Prozesse wie Neurotransmission, Sekretion, Muskelkontraktion, Zellproliferation und vieler weiterer [Chattopadhyay et al., 1996; Clapham, 1995]. Viele Funktionen, die Epithelien ausüben, werden über Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration erreicht [Zhang et al., 1999], weshalb der Kalziumhaushalt des Körpers streng reguliert ist und ein Gleichgewicht zwischen Absorption im Darm, Rückgewinnung in der Niere und Austausch mit den Knochen besteht. Die Knochen bilden zusammen mit den Zähnen den größten Kalziumspeicher, in denen 99% des Kalziums im humanen Körper mineralisiert vorliegen [Khanal et al., 2008; Peng et al., 2003; Schmidt, 2000]. Zu den drei Hauptorganen mit kalziumtransportierenden Epithelzellen zählen Darm, Niere und Plazenta, wobei der Transport entweder parazellulär über die tight junctions entlang des Konzentrationsgefälles (passiv), oder in einem aktiven Transportprozess durch die Epithelzellen hindurch (transzellulär) erfolgen kann. Dabei tritt Kalzium durch die apikale Membran in die Zelle ein, wird durch die Zelle hindurchgeleitet und auf der basolateralen Seite aus der Zelle geschleust [Peng et al., 2003]. Da tight junctions recht undurchlässig für Kalziumionen sind, erfolgt die

Kalziumreabsorption überwiegend über den transzellulären Weg [Hoenderop et al., 2005]. Für die apikale Kalziumaufnahme sind zwei epitheliale Kalziumkanäle verantwortlich, die zur Familie der transient receptor potential (TRP)-Kanäle gehören. TRPV6 ist hauptsächlich für den epithelialen Ca^{2+} -Transport im Darm verantwortlich, während TRPV5 die renale Ca^{2+} -Reabsorption reguliert [Peng et al., 2003]. Beide TRP-Kanäle werden auch in der Plazenta exprimiert, in der der transzelluläre Transport nach ähnlichen Mechanismen erfolgt wie in der Niere [Belkacemi et al., 2005].

1.2 Kalziumtransportierende Gewebe – Niere und Plazenta

1.2.1 Kalziumtransport in der Niere

Die Niere spielt eine wichtige Rolle bei der Kalziumhomöostase des Körpers durch die Regulation der Kalziumexkretion. Täglich werden ca. 8 g Kalzium in der Niere filtriert, wovon aber nur weniger als 2% ausgeschieden werden, was bedeutet, dass ein hoher Anteil beim Passieren des Nephrons zurück gewonnen wird [Hoenderop et al., 2005]. Der größte Teil der Resorption (~65%) findet passiv im proximalen Tubulus (PT) statt [Friedman, 1999; Reilly et al., 2000; Sutton et al., 1975], aber auch im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TAL, thick ascending limb) werden etwa 20% des gefilterten Ca^{2+} passiv durch das tight junction Protein Claudin-16 wieder absorbiert [Biner et al., 2002; Friedman, 1988; Loffing et al., 2001]. Im distalen Tubulus, bestehend aus dem distalen Konvolut (distal convoluted tubule, DCT1 und DCT2) und dem Verbindungstubulus (connecting tubule, CNT), findet noch eine Feinabstimmung der Kalziumresorption statt, wobei bis zu 15% aus dem Filtrat reabsorbiert werden [Costanzo et al., 2000]. Da der transzelluläre Kalziumtransport entgegen den existierenden elektrochemischen Gradient erfolgt, ist dies nur über einen aktivem Transportprozess möglich [Hoenderop et al., 2005]. Der Transport erfolgt mit Hilfe Ca^{2+} -transportierender Proteine in der apikalen und basolateralen Membran sowie im Zytosol der Epithelzellen. Der Einstrom erfolgt ohne Energieverbrauch entlang des Konzentrationsgefälles für freies Kalzium zwischen dem extrazellulären Raum (1 mM) und dem Zytosol (100 nM) mit Hilfe epithelialer Kalziumkanäle (vorwiegend TRPV5) [Hoenderop et al., 1999]. Der anschließende intrazelluläre Ca^{2+} -Transport erfolgt durch die kalziumbindenden Calbindin-Proteine ebenfalls energieunabhängig. Das Ausschleusen von Kalzium über die basolaterale Membran ist dagegen nur durch aktiven Transport mit Hilfe der beiden Kalziumtransporter PMCA1b (plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase 1b) und NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) möglich [Hoenderop et al., 2003a; van Abel et al., 2005a]. Diese

beschriebenen Proteine sind vor allem im letzten Abschnitt des distalen Tubulus der Niere (DCT2, CNT) koexprimiert [Hoenderop et al., 2000; Loffing et al., 2001] (Abb. 1).

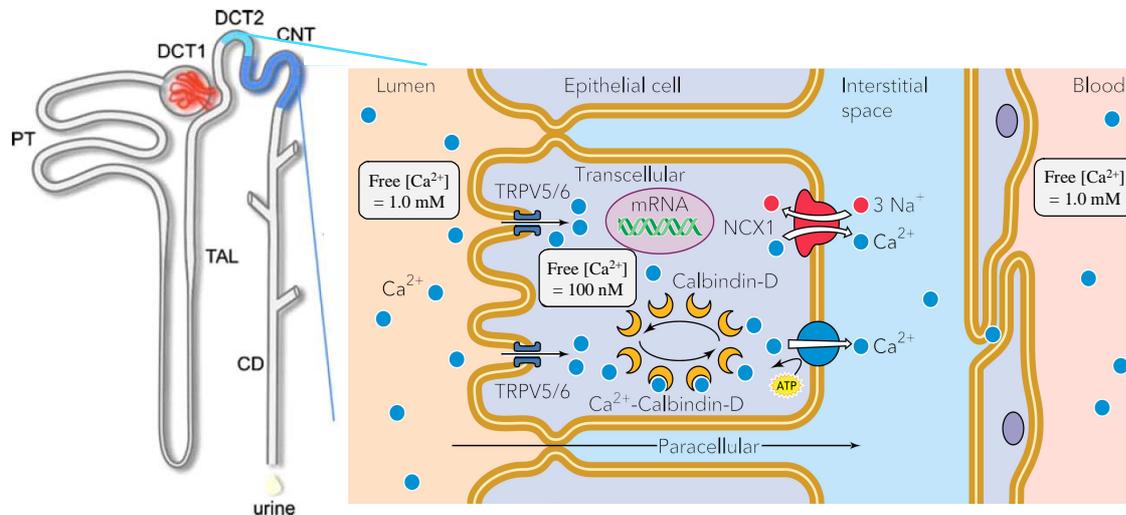


Abb. 1: Transzelluläre Kalziumresorption in der Niere. Zur Resorption von Ca^{2+} aus dem Primärharn wird in der Niere der größte Teil paracellulär im proximalen Tubulus (PT) und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TAL) transportiert. Nur die Feinabstimmung findet im letzten Abschnitt des distalen Tubulus (DCT2 und CNT) statt. Der Einstrom aus dem Lumen in die Zelle erfolgt entlang dem Konzentrationsgefälle durch epitheliale Kalziumkanäle (TRPV5/6), innerhalb der Zelle binden und transportieren Carrierproteine (Calbindin D) die Kalziumionen zur basolateralen Membran, wo sie aktiv entgegen eines starken Konzentrationsgradientes über die beiden Kalziumtransporter PMCA1b und NCX1 ins Blut freigesetzt werden. DCT: distales Konvolut; CNT: Verbindungstubulus; CD: Sammelrohr (Bilder verändert nach [Boros et al., 2009] und [Hoenderop et al., 2008])

1.2.2 Kalziumtransport in der Plazenta

Neben dem Dünndarm und der Niere ist die Plazenta das dritte Organ, in dem der Kalziumtransport über ein Epithelium eine wichtige Rolle spielt. Während der Fetogenese in Säugetieren ist die Plazenta grundlegend für die Entwicklung und das Wachstum des Fötus verantwortlich. Zu ihrer Funktion zählen der Nährstoff- und Gasaustausch, die Regulation des Wasserhaushalts sowie die Exkretion und Synthese der schwangerschaftsrelevanten Hormone, aber auch die Ausbildung der immunologischen Toleranz der Mutter gegenüber fetopaternalen Antigenen [Lafond et al., 2006; Moffett et al., 2006]. Diese Toleranz ist gerade in der hämochorialen Plazenta, wie sie beim Menschen und Nagetieren zu finden ist, wichtig, da die Trophoblastenzellen in die maternalen Blutgefäße des Uterus eindringen, sie aufbrechen und das Blut in den intervillösen Raum freisetzen (Abb. 2). Dadurch steht die äußere Schicht der Chorionzotten, der Synzytiotrophoblast (kindlichen Ursprungs), in direktem Kontakt zum mütterlichen Blut [Moffett et al., 2006], wobei der maternale und fötale Kreislauf durch dieses Epithelium getrennt bleiben [Faulk et al., 1983]. Der Synzytiotrophoblast (STB), der aus dem darunter liegenden Zytotrophoblasten gebildet wird, ist ein echtes Synzytium ohne laterale Zellmembranen mit villösen Ausstülpungen

(Mikrovilli) an der apikalen, zur Mutter gerichteten Oberfläche [Gaunt et al., 1986; Lafond et al., 2006; Sibley, 2009]. Die dadurch stark vergrößerte Oberfläche ist vor allem von großer Bedeutung, da der Synzytiotrophoblast für Transportprozesse in der materno-fötalen Nährstoff- und Ionenversorgung verantwortlich ist [Boyd, 1987; Hill et al., 1980; Munro et al., 1983]. Wie in anderen Epithelzellen auch, sind die Unterschiede bezüglich der Art, Anzahl und Aktivität von Transportern und Kanälen in der basalen und apikalen Membran ausschlaggebend für den gerichteten Transport zum Fötus hin [Eaton et al., 1981; Smith et al., 1992]. Eines der Ionen, das über den Synzytiotrophoblasten vom mütterlichen Blut zum Kind transportiert wird, ist Kalzium. Während der gesamten Schwangerschaft werden ca. 25 g Kalzium aktiv transportiert, wobei 80% davon im letzten Trimenon vor allem zur Mineralisierung der Knochen aufgenommen werden [Gertner et al., 1986]. Der Transport erfolgt aktiv zum Fötus, um die im Vergleich zum mütterlichen Blut höher liegende Kalziumkonzentration aufrecht zu erhalten und somit die ausreichende Versorgung des Fötus während der gesamten Schwangerschaft zu garantieren [Kovacs et al., 2001]. Der Transportmechanismus selbst funktioniert wie in anderen Epithelien, und analog der Kalziumresorption in der Niere, durch Aufnahme von Kalzium über die maternal-gelegene Apikalmembran, Diffusion durch die Zelle zur basolateralen Membran, wo es aktiv in die Blutbahn des Fötus hin ausgeschleust wird. Mögliche Kandidaten für die Aufnahme an der apikalen Membran sind auch hier die epithelialen Kalziumkanäle TRPV5 und TRPV6 [Moreau et al., 2002a; Moreau et al., 2002b].

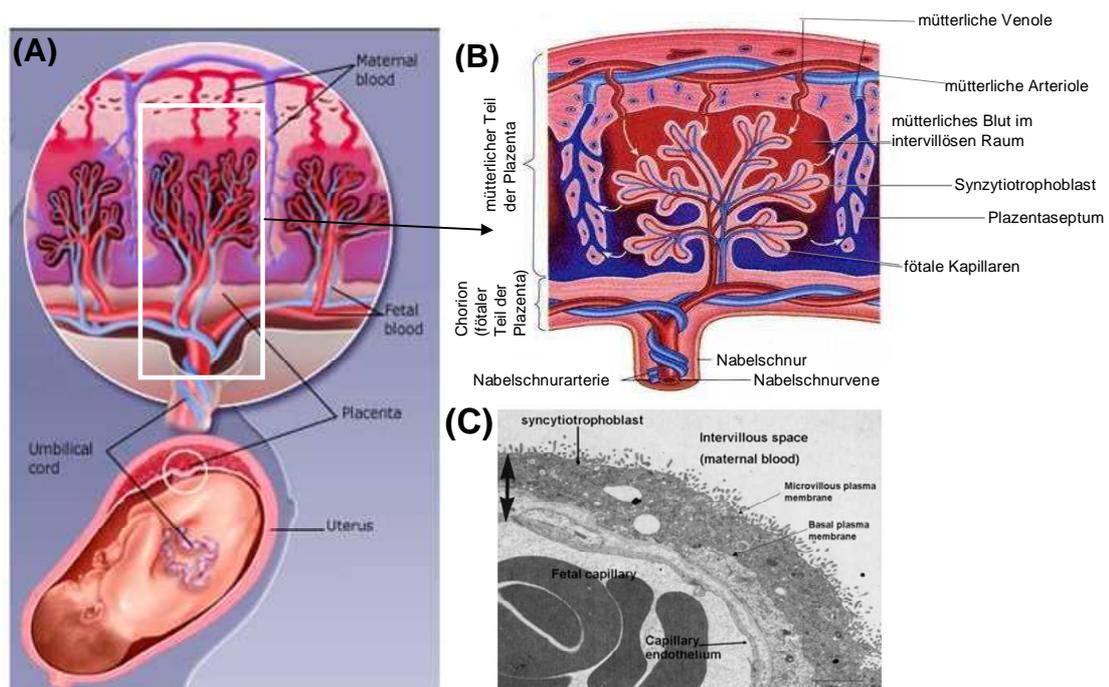


Abb. 2: Aufbau der humanen Plazenta. (A) Die Plazenta ist über die Nabelschnur mit dem Fötus verbunden und auf der gegenüber liegenden Seite in den Uterus der Mutter eingewachsen (Dezidua). Bei der Entwicklung der Plazenta werden die Wände der mütterlichen Blutgefäße aufgebrochen und münden dann direkt in den intervillösen Raum, der dadurch mit dem Blut der Mutter gefüllt wird. In diesen Raum ragen die Zotten aus kindlichem Gewebe, mit den fötalen Kapillaren, die über eine spezielle Zellschicht, den Synzytiotrophoblasten, vom mütterlichen Blut getrennt sind und der das Epithelium bildet, über das die Nährstoffe zwischen Mutter und Fötus ausgetauscht werden [Bild: Homepage Horizon Blue Cross Blue Shield of New Jersey]. (B) Vergrößerte Darstellung eines einzelnen Zottenbaums aus (A) [Bild: Homepage der Cornell University, New York]. (C) Der Querschnitt durch einen Zottenbaum zeigt den Synzytiotrophoblasten mit der mikrovillösen apikalen Membran und der Basolateralmembran, die direkt an die darunter liegenden fötalen Kapillaren grenzt. [Sibley, 2009]

1.3 Die TRP-Superfamilie

"Transient receptor potential" Proteine bilden eine Superfamilie aus Kationen-selektiven Kanälen, deren erstes Mitglied in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde [Montell et al., 1989]. Das Gen wird in den Fliegen in Photorezeptorzellen der Augen exprimiert und wurde dadurch entdeckt, dass die Fliege mit einer Mutation im *trp*-Lokus auf einen Lichtreiz nicht mit einem anhaltenden, sondern einem transienten Rezeptorpotential antwortet und einen stark verminderten Ca^{2+} -Einstrom zeigt [Hardie et al., 1992].

Tabelle 1: Mitglieder der TRP-Superfamilie. Anzahl der identifizierten TRP-Proteine der verschiedenen Organismen in den einzelnen TRP-Unterfamilien. [Venkatachalam et al., 2007]

	Worms	Flies	Mice	Humans
TRPC	3	3	7	6 ¹
TRPV	5	2	6	6
TRPM	4	1	8	8
TRPA	2	4	1	1
TRPN	1	1	0	0
TRPP ²	1	1	3	3
TRPML	1	1	3	3
Total	17	13	28	27

Strukturanalysen [Montell et al., 1989] und heterologe Expressionsstudien [Vaca et al., 1994; Xu et al., 1997] ergaben, dass es sich tatsächlich um ein integrales Membranprotein mit mehreren Transmembranbereichen handelt und eine neue Art von Ca^{2+} -permeablen Kationen-Kanälen darstellt. Auf der Suche nach verwandten Genen und Proteinen wurden Vertreter in Fliegen, Würmern, Fischen und Säugetieren gefunden, die meisten in der Maus mit 28 verschiedenen Proteinen (27 im Mensch, da TRPC2 ein Pseudogen ist) (Tabelle

1). In Pflanzen und Bakterien konnten keine Vertreter identifiziert werden. Ein gemeinsames Strukturmerkmal aller Mitglieder ist die Topologie mit sechs putativen Transmembrandomänen (TM) und einer kationenleitenden Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment. Bezüglich der Ionenleitfähigkeit sind bis auf zwei Mitglieder (TRPM4 und TRPM5) alle permeabel für Kalzium [Flockerzi, 2007; Montell, 2005]. Weiterhin sind sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus intrazellulär gelegen. Wie in Tabelle 1 und Abb. 3 zu sehen ist, können die einzelnen Mitglieder in die sieben Unterfamilien TRPC (classical), TRPV (vanilloid receptor), TRPM (melastatin), TRPA

(ankyrin), TRPN (NOMPC), TRPP (polycystin) und TRPML (mucolipin) basierend auf Homologien in der Aminosäuren-Zusammensetzung eingeteilt werden.

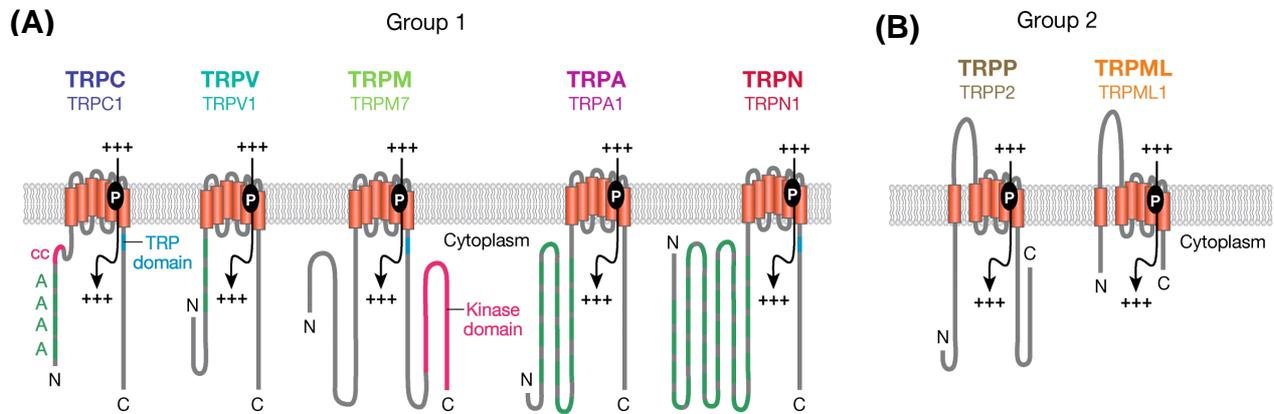


Abb. 3: Die TRP-Superfamilie. (A) Darstellung einzelner Vertreter jeder Unterfamilie der ersten Gruppe der TRPs und (B) jeweils ein Vertreter der Gruppe 2. Gezeigt ist die charakteristische 6 TM-Topologie der Proteine und die Lage der Porenregion (P) für die Kationenleitung (+++ und Pfeil). N, Aminoterminus; C, Carboxyterminus; A, Ankyrinrepeats (grün); cc, "coiled-coil"-Domäne. [Venkatachalam et al., 2007]

Die Namensgebung basiert jeweils auf dem ursprünglichen Namen, des ersten identifizierten Mitglieds [Montell et al., 2002]. Die Unterteilung der TRP-Familien in zwei Gruppen (siehe

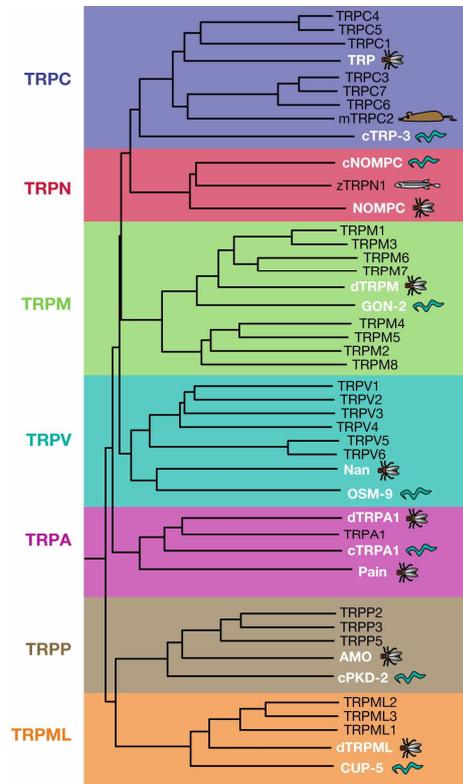


Abb. 3 A bzw. B) basiert auf Sequenz- und Topologieunterschieden, wobei die Mitglieder der ersten Gruppe, und hier vor allem die TRPCs, die nächste Verwandtschaft zum ursprünglichen Drosophila-Gen aufweisen. Die Vertreter der zweiten Gruppe zeigen nur einen entfernten Verwandtschaftsgrad zu den anderen Mitgliedern und haben zusätzlich zu den oben beschriebenen Strukturen eine charakteristische große Schleife zwischen den Transmembransegmenten 1 und 2. Die Verwandtschaftsbeziehungen von TRP-Genen der Wirbeltiere sind in Abb. 4 dargestellt.

Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der TRP Proteine. Dargestellt sind vorwiegend humane Mitglieder der einzelnen Familien, außer für TRPC2 (Maus) und TRPN1 (Zebrafisch) für die es keinen humanen Vertreter gibt. Weißer Namen mit Bildern stehen für je einen Vertreter der Untergruppen aus *C. elegans* und *Drosophila melanogaster*. [Venkatachalam et al., 2007]

1.4 Die TRPV-Familie

TRPV Proteine weisen im Bereich der TM 5 und 6 eine 25%-ige Homologie zu den klassischen TRP Kanälen (TRPC) auf [Montell, 2005]. Die ersten Proteine dieser Familie wurden in *C.elegans* (OSM-9) und der Ratte (TRPV1) gefunden, als Rezeptor für das Vanilloid Capsaicin [Caterina et al., 1997; Colbert et al., 1997]. Innerhalb der Familie können zwei Untergruppen unterschieden werden, die nur 30% Homologie untereinander besitzen; einmal TRPV1-4, denen allen die Eigenschaft gemeinsam ist, dass sie durch Hitze aktiviert werden und die beiden anderen Mitglieder TRPV5 und TRPV6, die eine Sequenzhomologie von ~75% aufweisen [Hoenderop et al., 2001b]. Diese beiden werden nicht durch Hitze aktiviert und sind innerhalb der gesamten TRP-Familie der Säugetiere die Kanäle mit der größten Kalziumselektivität ($P_{Ca}:P_{Na} > 100$, im Vergleich zu den anderen TRPs: $P_{Ca}:P_{Na} = 1-10$) [Montell, 2005]. Beide Kanäle sind aber in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium auch permeabel für monovalente Kationen [Yue et al., 2001], mit folgender Prävalenz bei TRPV5: $Na^+ > Li^+ > K^+ > Cs^+$ [Nilius et al., 2000; Vennekens et al., 2000].

1.5 Der epitheliale Kalziumkanal TRPV5

Das für TRPV5 kodierende Gen wurde erstmals 1999 aus dem distalen Konvolut der Kaninchenniere kloniert und ursprünglich, analog zu dem bekannten epithelialen Na^+ Kanal ENaC, "epithelial Ca^{2+} channel 1" (ECaC1) genannt [Hoenderop et al., 1999] (alternativer Name: CaT2, Calcium transport protein 2). Das humane Gen liegt auf Chromosom 7q35 direkt neben dem Gen für das verwandte Protein TRPV6 und genauso wie in der Maus, wo beide Gene auf Chromosom 6 lokalisiert sind [Muller et al., 2000b; Peng et al., 2000b; Weber et al., 2001]. Die beiden homologen Gene liegen nicht nur direkt nebeneinander sondern auch ihre Intron/Exon-Struktur mit 15 Exons ist konserviert [Peng et al., 2001], was vermuten lässt, dass sie durch Genduplikation entstanden sind. Dafür spricht, dass auch in phylogenetisch älteren Organismen nur ein Gen dieser Art vorhanden ist [Qiu et al., 2004]. Das Gen kodiert ein Protein mit einer Länge von 723 (bei Maus, Ratte) bis 730 (bei Kaninchen) Aminosäuren, mit 729 Aminosäuren beim Menschen. Das Protein besitzt eine Molekularmasse von ~83 kDa. Die Expression von TRPV5 ist beim Mensch sowie bei Maus, Ratte und Kaninchen (vorwiegend untersucht auf RNA Ebene) am höchsten in der Niere. Aber auch im Dünndarm und Pankreas sind die Expressionsraten höher, als im Verhältnis zu anderen Geweben wie Gehirn, Prostata, Hoden, Osteoklasten und der Plazenta [Hoenderop et al., 2001b; Janssen et al., 2002; Muller et al., 2000a; Peng et al., 2000a; Weber et al., 2001]. Dabei ist nicht nur im

Darm sondern auch im Synzytiotrophoblast der Plazenta die Expression von TRPV5 wesentlich geringer als die von TRPV6 [Peng et al., 2001; Van Cromphaut et al., 2001]. Dass TRPV5 bei der Kalziumhomöostase des Körpers eine wichtige Rolle spielt, wird in TRPV5 Knockout-Mäusen (TRPV5^{-/-}) deutlich, die unter Hyperkalziurie und Polyurie leiden und 6-fach mehr Kalzium ausscheiden als Wildtyp-Tiere, da die Ca²⁺-Reabsorption in der Niere unterbunden ist [Hoenderop et al., 2003b]. Allerdings wird durch die vermehrte Expression von aktivem Vitamin D3 (1 α 25(OH)₂D3) die intestinale Kalzium-Absorption aus der Nahrung erhöht und dadurch der Kalziumspiegel im Serum im Normalbereich erhalten [Renkema et al., 2005]. Trotz eines normalen Körpergewichts weisen Knockout-Mäuse eine verminderte Knochendichte des Femurkopfes. Eine andere Studie mit TRPV5^{-/-} Mäusen beschreibt eine Rolle von TRPV5 in den Osteoklasten, deren Anzahl und Größe im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zwar erhöht sind, aber überraschenderweise im *in vitro* Zellkultursystem eine verminderte Funktion dieser nachzuweisen ist [van der Eerden et al., 2005].

1.5.1 Strukturelle und funktionelle Charakteristika des TRPV5-Proteins

Das TRPV5 Protein (Abb. 5 A) besitzt sechs putative Transmembrandomänen mit einem kurzen hydrophoben Abschnitt zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment, welcher die Porenregion definiert [Hoenderop et al., 2002b]. Ein einzelner Aspartatrest (D542) in diesem Bereich, der auch im TRPV6 Protein konserviert ist, ist für die Kalziumselektivität verantwortlich. [Gunthorpe et al., 2002; Nilius et al., 2001b; Vennekens et al., 2001]. Bei der Ausbildung eines Tetramers aus vier Proteinen bilden vier zueinander gerichteten negativen Aspartatreste einen so genannten Selektivitätsfilter für die Kalziumionen (Abb. 5 B) [Nilius et al., 2001b]. Eine Mutation zu Alanin und sogar der Austausch gegen ein negativ geladenes Glutamat verhindert die Ca²⁺-Permeation komplett, hat aber keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit für monovalente Ionen [Nilius et al., 2001b]. Außerdem besitzt TRPV5 eine konservierte N-Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Schleife zwischen TM eins und zwei, an Position N358. Durch eine posttranslationale Modifikation vom komplexen Typ an dieser Stelle wird das apparente Molekulargewicht in einer SDS-PAGE von ~83 auf bis zu 100 kDa erhöht [Hoenderop et al., 2003c]. Der N- und C-Terminus liegt jeweils intrazellulär und beide beinhalten verschiedene Sequenzmotive, wie z.B. fünf N-terminale Ankyrin-Repeats, von denen drei in den TRPV5/6 Kanälen konserviert sind, N- und C-terminal eine PDZ-Domäne und mehrere putative Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC), die cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase (PKA und cGK) sowie die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) [den Dekker et al., 2003;

Hoenderop et al., 1999]. Ankyrin- und PDZ-Domänen sind Strukturmerkmale, die für Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen. Für die Ankyrin-Motive wird eine wichtige Rolle bei der Assemblierung mehrerer Kanaluntereinheiten angenommen, wobei vor allem innerhalb des ersten N-terminalen Motivs, speziell im Bereich von Aminosäuren 64-77 eine Interaktionsdomäne identifiziert wurde [Chang et al., 2004]. Auch PDZ-Domänen sind teilweise an der Oligomerisierung von Ionenkanälen beteiligt [Tsunoda et al., 1999]. Wie für viele Ionenkanäle der Fall, wurde auch für TRPV5 und TRPV6, zumindest im Überexpressionssystem gezeigt, dass sie zu Homo- und Heterotetrameren oligomerisieren [Hoenderop et al., 2003c]. Je nach Stöchiometrie der einzelnen Untereinheiten bei den Heterotetrameren verändern sich die Ca^{2+} -Transporteigenschaften, so dass möglicherweise deren Zusammensetzung für eine Feinabstimmung der Kalziumströme von Bedeutung ist.

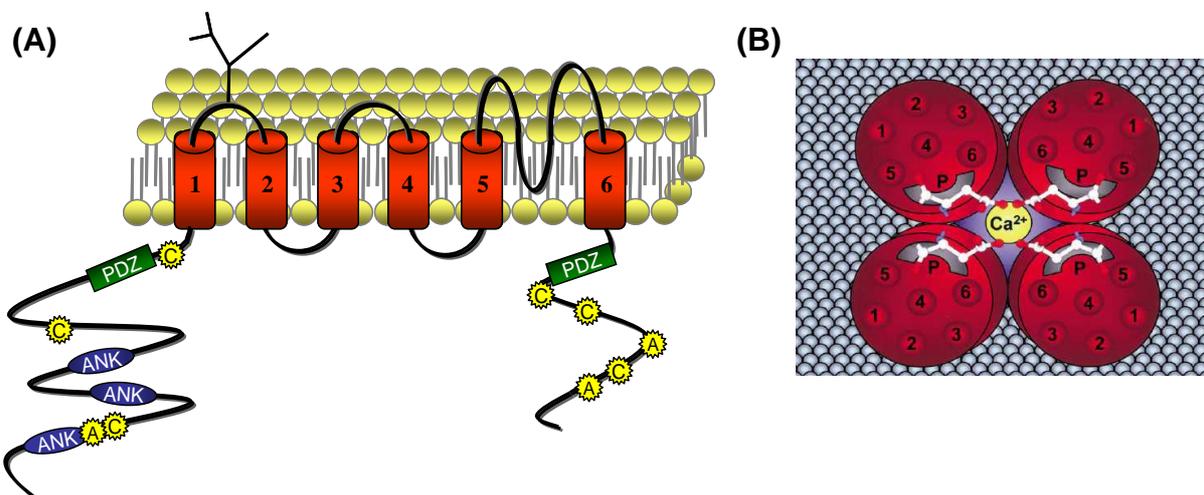


Abb. 5: Molekulare Struktur des epithelialen Kalziumkanals TRPV5. (A) Gezeigt ist die typische Struktur mit 6 TM-Domänen (1-6) und der intrazelluläre N- und C-Terminus des Proteins. Die Schleife zwischen dem 5. und 6. TM-Segment deutet die Porenregion an. Eine N-Glykosylierungsstelle befindet sich an AS-Position N358 ist gezeigt. Als Struktur-elemente der intrazellulären Bereiche sind die konservierten Ankyrin-Wiederholungen (ANK) im N-Terminus, die beiden PDZ-Domänen in grün (PDZ) und in gelb putative Phosphorylierungsstellen dargestellt (A: Phosphorylierung durch PKA und C: Phosphorylierung durch PKC). (B) Aufsicht auf einen Kanal mit tetramerer Struktur, wie er in der Membran eingebaut sein könnte. Die TM-Bereiche 5 und 6 sind jeweils zueinander gerichtet, so dass die Aspartatreste, die den Selektivitätsfilter bilden, in der Mitte liegen. (B) verändert nach [den Dekker et al., 2003]

Eine Sonderstellung nehmen TRPV5 und TRPV6 auch bei der Kanalaktivität ein, da sie bei heterologer Expression unter physiologischen Kalziumkonzentrationen und Membranpotentialen konstitutiv aktiv sind und nicht ligandenabhängig aktiviert werden [Vennekens et al., 2000; Vennekens et al., 2002]. Auch die einwärtsgerichtete Strom-Spannungscharakteristik ist entgegengesetzt zu der der anderen TRP-Kanäle [Gunthorpe et al., 2002]. Trotz der hohen Kalziumselektivität ist TRPV5 in geringem Maße auch durchlässig für andere zweiwertige Ionen ($\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} \approx \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$) [Vennekens et al., 2000; Vennekens et

al., 2001]. Weisen TRPV5 und TRPV6 viele Gemeinsamkeiten bezüglich funktioneller Eigenschaften auf, so gibt es auch Unterschiede in den Kanaleigenschaften bezüglich der Inaktivierung durch Kalziumionen, der Permeabilität für Bariumionen und der Sensitivität für Kanalblocker. Der Kanalblocker Ruthenium Rot inhibiert TRPV5 bei 100-fach geringerer Konzentration als TRPV6 [Hoenderop et al., 2001b].

1.5.2 Regulation von TRPV5

Der Kalzium-Einstrom durch TRPV5 wird auf drei verschiedenen Ebenen kontrolliert. Erstens wird die Genexpression u.a. von verschiedenen Hormonen (Vitamin D3, Östrogen, PTH) beeinflusst. Zweitens kann die Kanalaktivität moduliert werden und so die Kalziumaufnahme regulieren und drittens sind einige Faktoren bekannt, die die Transportprozesse und den Einbau des TRPV5 Kanals in die Plasmamembran beeinflussen (Abb. 6 + Abb. 7). Die einzelnen Faktoren werden im Folgenden unterteilt nach Hormonen, Ionen und interagierenden Proteinen beschrieben.

1.5.2.1 Regulation durch Hormone

Die biologisch aktive Form von Vitamin D, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, ist ein wichtiger Regulator des Kalziumhaushalts des Körpers, vor allem bei der Ca^{2+} -Resorption in epithelialen Geweben. Mehrere Studien unter anderem mit Knockout-Modellen haben gezeigt, dass Vitamin D einen starken Einfluss auf den Expressionslevel von TRPV5 mRNA und Protein hat, und diesen anheben kann. So sind in 1α -OHase Knockout-Mäusen, die kein aktives Vitamin D3 aus der Hormonvorstufe bilden können, in Vitamin D-Mangel-Ratten und in Mäusen mit mutiertem Vitamin D-Rezeptor die Expressionslevel von TRPV5 mRNA und Protein vermindert. Diese können durch Zugabe von Vitamin D wieder angehoben und normalisiert werden [Hoenderop et al., 2001a; Hoenderop et al., 2002a; Weber et al., 2001]. Die Regulation erfolgt wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene, da in der TRPV5-DNA mehrere Vitamin D-abhängige Elemente (VDRE) identifiziert wurden [Muller et al., 2000b]. Parallel werden in der Niere auch die anderen Ca^{2+} transportierenden Proteine Calbindin $\text{D}_{28\text{k}}$ und NCX1 durch Vitamin D3 auf Transkriptionsebene positiv reguliert [Hoenderop et al., 2002a].

Wie Vitamin D3 hat auch das Parathormon (PTH) einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase; bei erhöhter Kalziumkonzentration im Plasma wird es vermindert ausgeschieden. Van Abel und Mitarbeiter [van Abel et al., 2005b], konnten zeigen, dass PTH-ektomierte Ratten eine

verminderte renale TRPV5-, Calbindin D_{28K}-, und NCX1-Expression aufwiesen. Durch äußere Zugabe von PTH konnte die normale Proteinexpression allerdings wieder hergestellt werden. Erst kürzlich wurde der mögliche Signalweg für diese Regulation gefunden [de Groot et al., 2009]. PTH stimuliert die Ca²⁺-Aufnahme über den Adenylyl-Cyclase - cAMP (zyklisches Adenosin-monophosphat) - Proteinkinase A-Weg. Durch eine PTH induzierte Erhöhung von cAMP wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche den Threoninrest 709 im TRPV5-Protein phosphoryliert (siehe Abb. 5 A), dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht und so den Ca²⁺-Einstrom steigert.

Östrogen ist ein Hormon, das die Knochenmineralisierung beeinflusst und dessen Mangel in postmenopausalen Frauen in einer Entmineralisierung der Knochen aufgrund eines negativen Kalzium-Gleichgewichts resultiert. Die TRPV5 Expression durch Östrogen ist, wie auch bei Vitamin D3, auf transkriptioneller Ebene geregelt, was zu einer erhöhten Expression (mRNA und Protein) führt. Dadurch kann vermehrt Kalzium zur korrekten Knochenmineralisierung aufgenommen werden [van Abel et al., 2002].

Ähnlich wie Östrogen scheint auch das "anti-aging" Hormon Klotho an der Regulation der Knochenmineralisierung beteiligt zu sein, da Knockout-Mäuse eine Verringerung der Knochendichte zusammen mit einer leichten Hyperkalzämie (erhöhte Kalziumwerte im Blut) zeigen [Kuro-o et al., 1997]. Klotho, ein Proteohormon, besitzt eine große extrazelluläre Domäne, die nach Abspaltung in Urin und Serum sekretiert wird und eine β -Glucuronidase-Aktivität besitzt [Tohyama et al., 2004]. Diese Untereinheit besitzt einen stimulierenden Effekt auf TRPV5 dahingehend, dass durch eine vermehrte Expression an der Zelloberfläche die TRPV5-vermittelte Ca²⁺-Aufnahme erhöht wird [Chang et al., 2005]. Dabei spielt die Glykosylierung von TRPV5 an dem Asparaginrest 358 eine wichtige Rolle. Durch die Wechselwirkung von TRPV5 und der β -Glucuronidase werden die endständigen Sialinsäurereste von dem komplexen Zuckergerüst abgespalten. Die darunter liegenden Zuckerreste dienen dann als Ligand für Galectin-1, welches somit die TRPV5 Kanäle an der Oberfläche verankert. Die erhöhte Kalziumaufnahme basiert nicht auf einer vermehrten Expression der Kanäle, sondern wird durch deren Akkumulation in der Plasmamembran bzw. eine unterbundene Endozytose von TRPV5 Kanälen ausgelöst [Cha et al., 2008].

1.5.2.2 Regulation durch Ionen

Kalzium, für welches der TRPV5 Kanal die höchste Leitfähigkeit besitzt, ist zugleich auch ein Inhibitor des Kanals. Die Erhöhung der freien $[Ca^{2+}]_i$ (normal 100 nM) führt zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem TRPV5 inaktiviert wird [Nilius et al., 2001a]. Zur Regulation dienen zwei Bereiche im C-Terminus von TRPV5, einmal die letzten 30 Aminosäuren und zum anderen die Aminosäuren 650-653 [Nilius et al., 2003]. Weiterhin ist das Recycling von TRPV5 Kanälen innerhalb der Zelle durch Kalzium beeinflusst. Die Internalisierung selbst ist nicht beeinflusst, aber der Wiedereinbau von internalisierten Kanälen (Recycling) in die Plasmamembran ist im Zellkultursystem abhängig von intrazellulärem Kalzium [van de Graaf et al., 2008].

Intrazelluläres Magnesium inhibiert reversibel die TRPV5 Aktivität bei negativen Membranpotentialen konzentrationsabhängig in einem langsamen (30-40 s) Prozess und in einem schnelleren, Spannungs-abhängigen Schritt [Lee et al., 2005]. Dazu bindet das Mg^{2+} direkt an den Aspartatrest an Position 542 (Ca^{2+} -Pore) und verändert die Konformation des Kanals.

Sowohl der extrazelluläre als auch der intrazelluläre pH-Wert haben einen Einfluss auf die TRPV5 Aktivität. Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus in der Literatur kontrovers beschrieben wird, ist allen Studien gemeinsam, dass eine Erniedrigung des pH-Werts zur Inhibierung und eine Alkalisierung zur Aktivitätssteigerung führt. Als pH-abhängiger Regulationsweg wird einmal die direkte Kontrolle der Proteinexpression durch den Säure-Base-Status beschrieben [Nijenhuis et al., 2006], oder zum anderen das Vorhandensein eines pH-Sensors durch die Aminosäuren Glutamat 522 (extrazellulär) und Lysin 607 (intrazellulär) [Yeh et al., 2003; Yeh et al., 2005; Yeh et al., 2006]. In einer anderen Studie wurden gezeigt, dass eine extrazelluläre Alkalisierung die Insertion von TRPV5-Kanälen aus Vesikeln in die Plasmamembran stimuliert [Lambers et al., 2007].

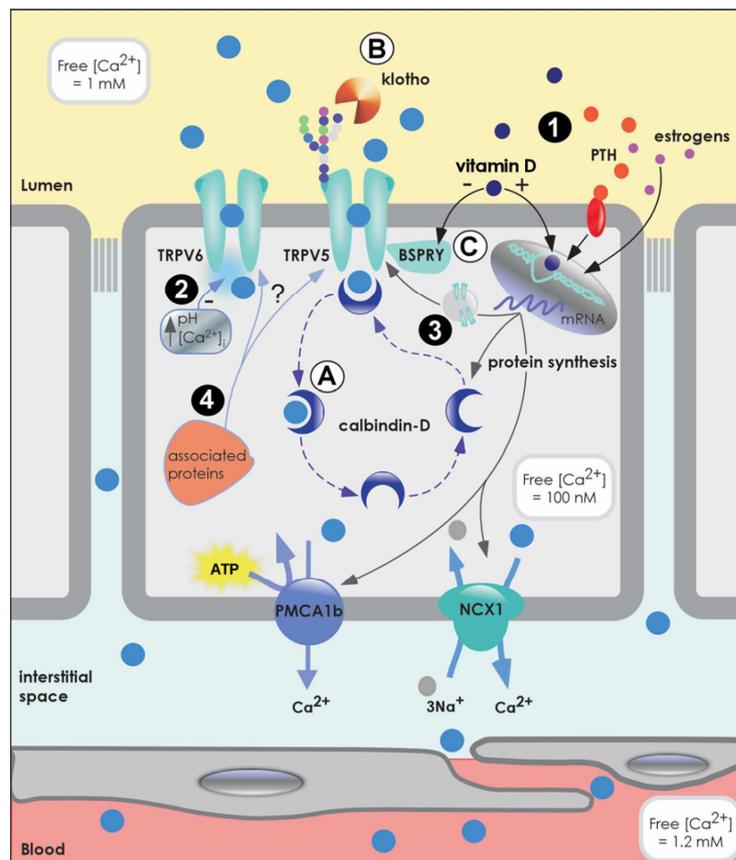


Abb. 6: Regulation von TRPV5 durch verschiedene Faktoren. Die Regulation von TRPV5 und damit der Kalziumaufnahme in Epithelien kann auf transkriptioneller Ebene, vor allem durch Hormone (ausgenommen Klotho), geregelt werden (1), oder durch Beeinflussung der Kanal-Aktivität (2) und dem Transport von Kanälen in Vesikeln zur Plasmamembran (3) sowie durch assoziierte Proteine (4). PTH: Parathormon; ATP: Adenosintriphosphat. [Schoeber et al., 2007].

1.5.2.3 Regulation durch Interaktionspartner

Zu den ersten identifizierten Interaktionspartnern von TRPV5 zählen die Proteine S100A10 und Annexin2 [van de Graaf et al., 2003]. S100A10 gehört zur S100-Proteinfamilie, besitzt jedoch veränderte EF-Hand-Motive und kann so keine Kalziumionen mehr binden. Normalerweise bilden Annexin2 und S100A10 einen tetrameren Komplex aus jeweils einem Homodimer aus [Gerke et al., 2002]. Die daraus resultierende Bindung von Annexin2 an TRPV5 erfolgt dabei nur indirekt über S100A10, dessen Bindung an TRPV5 auf einen bestimmten Bereich im C-Terminus (Sequenz: VATTV) begrenzt ist [van de Graaf et al., 2003]. Das erste Threonin scheint für die Interaktion essentiell zu sein, da eine Mutation dieser Aminosäure die Bindung unterbindet, die subzelluläre Lokalisation von TRPV5 verändert und mit einem verminderten Kalziumstrom einher geht. Daher wird vermutet, dass die Bindung des S100A10/Annexin-Komplexes an der Translokation von TRPV5-Kanälen zur Plasmamembran beteiligt ist.

Rab11a, eine GTPase, ist ein weiterer Interaktionspartner von TRPV5 und in den Proteintransport mit Hilfe von Recycling-Vesikeln involviert. Beide Proteine kolokalisieren in Vesikeln nahe der Plasmamembran. Es wurde eine direkte Interaktion im gleichen C-terminalen Bereich (MLERK) nachgewiesen, in dem auch 80K-H bindet, ein Protein, dem bei der Regulation von TRPV5 eine Ca^{2+} -Sensor Funktion zugesprochen wird [Gkika et al., 2004; van de Graaf et al., 2006a]. Bei Rab11a geht man allerdings von einem Austausch von TRPV5 Kanälen aus intrazellulären Recycling-Endosomen mit der Plasmamembran aus, wobei das in seiner GDP-Form an TRPV5 gebundene Rab11a in Vesikeln durch GDP-GTP-Austausch abgelöst wird. Damit können die Vesikel, die vorher im Zytoplasma zurückgehalten wurden, zur Plasmamembran transportiert werden. Inwiefern Rab11a für den weiteren Transport zur Plasmamembran verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt [van de Graaf et al., 2006a].

Die beiden Kinasen der WNK (With-No-Lysin[K]-Familie WNK3 und WNK4 wurden als Interaktionspartner von TRPV5 im *Xenopus laevis*-Expressionssystem untersucht [Jiang et al., 2007; Zhang et al., 2008]. Dabei konnte bei Koexpression von WNK3 oder WNK4 mit TRPV5 eine erhöhte Kalziumaufnahme festgestellt werden, bedingt durch ein erhöhtes Vorkommen von glykosylierten TRPV5-Kanälen in der Plasmamembran. Von dem Protein WNK3 ist die Kinasedomäne dabei essentiell beteiligt und für WNK4 scheint die TRPV5-Glykosylierung von großer Bedeutung zu sein, da es ausschließlich auf glykosylierte TRPV5 Proteine einen stimulatorischen Effekt hat. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie im Zellkultursystem mit Säugerzellen beobachtet, dass WNK4 die Caveolae-vermittelte Endocytose (durch Caveolin-1) von TRPV5 begünstigt, was in einer verminderten Ca^{2+} -Aufnahme resultiert in [Cha et al., 2010].

Für die beiden Proteine NHERF2 (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 2) und SGK1 (Serum- und Glukokortikoidkinase 1), die beide PDZ-Domänen besitzen und somit an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein können, wurde bei Koexpression mit TRPV5 eine gesteigerte Aktivität festgestellt [Embark et al., 2004]. Als essentielle Elemente für die Aktivitätssteigerung von TRPV5 wurde bei NHERF2 die zweite PDZ-Domäne, und bei SGK1 die Kinasefunktion definiert [Palmada et al., 2005]. Die Interaktion von NHERF2 mit TRPV5 findet am absoluten C-Terminus über die drei letzten Aminosäuren (YHF) statt.

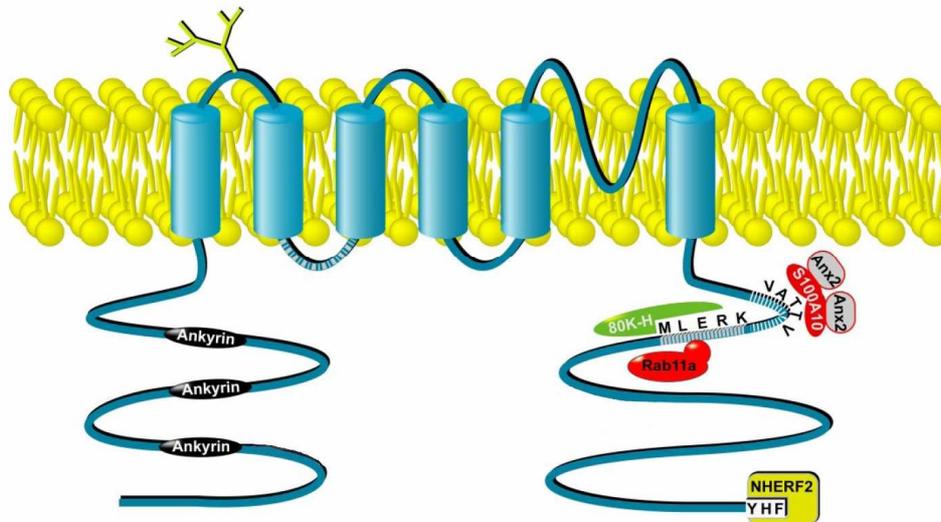


Abb. 7: Regulation von TRPV5 durch Interaktionspartner. In der Abbildung sind die Interaktionspartner des TRPV5 Proteins dargestellt, deren Bindungsregionen bekannt sind. Diese binden alle im C-Terminus. 80K-H sowie Rab11a binden beide in der gleichen Region. Anx2: Annexin A2. Verändert nach [van de Graaf et al., 2006b]

Neben den hier erwähnten gibt es noch weitere Proteine, die mit TRPV5 interagieren oder einen Einfluss auf die Aktivität des Ionenkanals haben, die aber an dieser Stelle nicht ausführlicher beschrieben werden. Dazu zählen unter anderem die Serinprotease Gewebe-Kallikrein (TK) [Gkika et al., 2006a] sowie die beiden Proteine FKBP52 (FK506-bindendes Protein 52) [Gkika et al., 2006b], ein Immunophilin und BSPRY (B-Box und SPRY-Domäne enthaltendes Protein) [van de Graaf et al., 2006c], die beide die Aktivität des TRPV5 Kanals vermindern, ohne den Expressionslevel zu beeinflussen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

TRPV5 ist ein Ionenkanal, der vor allem zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase des Körpers durch Resorption von Kalzium in der Niere beschrieben ist. Aber auch in anderen kalziumtransportierenden Epithelien wie der Plazenta wird er exprimiert. Ionenkanäle bestehen meist aus mehreren Untereinheiten und sind mit vielen Proteinen in komplexen Netzwerken assoziiert. Diese Proteine beeinflussen die Lokalisierung, Aktivität und die Selektivität der ionenleitenden Pore.

Einige der Interaktionspartner von TRPV5 wurden bereits mit der Hefe-2-Hybrid-Methode oder in gezielten biochemischen Suchen identifiziert und dann in heterologen Expressionssystemen untersucht. Die Proteinzusammensetzung des TRPV5 Ionenkanals im nativen Gewebe und die genaue Regulation sind bisher noch nicht verstanden. In dieser Arbeit sollen deshalb durch Anreicherung von TRPV5-Proteinkomplexen aus der Plazenta mittels verschiedener Verfahren, wie Antikörper-Affinitätschromatographie und GST-Pulldown Assays weitere Interaktionspartner aus dem nativen Gewebe isoliert werden.

Da zu Beginn meiner Arbeit keine kommerziellen Antikörper, die das TRPV5 Protein spezifisch erkennen vorliegen, sollen zunächst mehrere TRPV5-spezifische polyklonale Peptidantikörper generiert und diese charakterisiert werden. Dazu werden sowohl ELISA-Tests, Western Blot Analysen und IPs durchgeführt. Zusätzlich soll in immunhistochemischen Analysen die Spezifität der neuen TRPV5 Antikörper in Maus-Nierengewebe und die Lokalisation des Proteins in der Plazenta untersucht werden. Dann sollen mit Hilfe der affinitätsgereinigten, charakterisierten TRPV5 Antikörper präparative Antikörper-Affinitätssäulen hergestellt werden, um den gering exprimierten Ionenkanal aus der humanen Plazenta zusammen mit putativen Interaktionspartnern anzureichern. Die isolierten Proteine sollen mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie identifiziert werden. Alternativ sollen verschiedene N- und C-terminale GST-Fusionsproteine des TRPV5 Proteins für Pulldown-Experimente mit Plazentagewebeextrakten eingesetzt werden, um auch hier im Anschluss neue Interaktionspartner mittels massenspektrometrischer Analyse zu identifizieren.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Laborgeräte mit Bezeichnung und Hersteller

Laborgerät	Bezeichnung	Firma
3-D-Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Agarosegelkammer		Renner GmbH, Dannstadt
Ausschwing-Zentrifuge	Laborfuge 400 R	Heraeus, Hanau
Bakterienschüttler mit Inkubationshaube		Bühler Labortechnik, Hechingen
Blotsystem (groß)	TransBlot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, München
Blotsystem (klein)	MiniTransBlot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, München
Elektronische Präzisionswaage		BioRad, München
Elektronische Waage	ABS 120-4; EW 150-3 M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Evaporationszentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Gelsystem (groß)	Hoefer SE 600 Ruby	GE Healthcare, München
Gelsystem (klein)	Mini Protean 3 Electrophoresis System	Biorad, München
Geltrockner	Gel Dryer Model 583	BioRad, München
Glas-Teflon-Potter	5 ml, 15 ml, 25ml, 50 ml	Sartorius AG, Goettingen
Gradientenmischer		Cti, Münster
heizbares Wasserbad		Memmert, Schwabach
Heizblock	Rotilabo-Block-Heater H 250	Roth, Karlsruhe
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hammburg
Heizrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach
Kryostat	CM 3000	Leica Microsystems, Nussloch
Kühlsystem	MultiTempIII / ThemoHaake	Pharmacia Biotech, UK
Mikrotiterplattenphotometer	Multiscan EX	Thermo Labsystem, Egelsbach
Minizentrifuge (PCR-Tubes)	Spectrafuge Mini	Labnet, Woodbrige (USA)
Mixer	Commercial Blendor	Bender und Hobein, Zürich (CH)
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Netzteil	E815, E802	Consort, Turnhout (B)

PCR-Gerät	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Peristaltikpumpe	Pump P-1	Amersham, Bioscience, München
Peristaltikpumpe		Ismatec, Wertheim-Mondfeld
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW GmbH, Weilheim
Pipette	Finnpipette 1-10 ml	Thermo Labsystem, Langenselbold
Pipetten	2 µl-20 µl, 20 µl-200 µl, 100 µl-1000 µl, 1 ml-10 ml	Abimed, Langenfeld
Pipetten	0,1 µl-2,5 µl; 0,5 µl-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Rollenmischer	RM 5	Assistent, Berlin
Spektralphotometer	Ultrospec 2100pro	GE Healthcare, München
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad	Elmasonic One	Elma GmbH, Singen
Ultraschallgerät	Sonoplus UW 2200	Bandelin electronic, Berlin
Ultraturrax	DS-20; DS-8/P; DS-5/K	Art-Moderne Labortechnik, Müllheim-Hügelheim
Ultrazentrifuge	L8-70M Ultrazentrifuge Rotortyp: Sw 40, Ti 70	Beckman, München
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Zentrifuge	RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge; Rotortyp: GSA	Sorvall, Langenselbold

2.2 Materialien und Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, die nicht in der folgenden Tabelle aufgeführt sind, wurden alle von AppliChem, Darmstadt bezogen.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Materialien und Kits mit den jeweiligen Herstellern

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Chemikalienausgabe Universität Kaiserslautern
Acetonitril	Merck, Darmstadt
AcrylamidstammLösung Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Merck, Darmstadt

AminoLink Kit	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth Karlsruhe
BCA Protein Assay Kit (inkl. Proteinstandard)	Pierce, Rockford (IL)
Bromphenolblau	Amersham Bioscience, München
Carageen	Fluka+Riedel-de Haen, München
Chromatographie-Säulen	Sigma, München
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St.Leon-Rot
Coomassie Plus Protein Assay Kit	Pierce, Rockford
Deckgläser (24x32 mm; 24x40 mm)	Roth, Karlsruhe
DNA-Probenpuffer 6x Loding Dye solution	Fermentas, St.Leon-Rot
DNA-Marker GeneRuler DNA Laddermix	Fermentas, St.Leon-Rot
dNTP-Set	Fermentas, St.Leon-Rot
DSS	Thermo Scientific, Rockford (USA)
ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Entwicklerlösung	Agfa, Köln
Essigsäure	Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern
Ethanol	Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern
Fixierlösung	Agfa, Köln
Geextraktions Kit peqGold	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
Glutathion-Sepharose Protino	Macherey-Nagel, Düren
HiSpeed™ Plasmid Purification Midi Kit	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Konzentrier Röhrchen	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Magermilchpulver	Supermarkt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern
Mikropistille	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
NHS-Sepharose	GE Healthcare, München

Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Objektträger superfrost Ultra Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
PNGase F-Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Protein A Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein G Agarose	upstate, New York
Restriktionsenzyme	Fermentas, St.Leon-Rot
Röntgenfilme, Super RX	Fujifilm Corporation, Tokyo (Japan)
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer (NL)
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St-Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot
TEMED	Roth Karlsruhe
Thesit	Fluka+Riedel-de Haen, München
Triton X100	GE Healthcare, München
Triton X100, molecular biology grade	AppliChem, Darmstadt
Trypsin (Porcine)	Promega, Mannheim
Western Lightning Chemilumineszenz Reagent Plus	Perkin Elmer, Boston (USA)
Zahnstoher	Supermarkt

2.3 Puffer und Lösungen

Im Anschluss sind alle in der Arbeit verwendeten und im Methodenteil erwähnten Puffer und Lösungen aufgeführt. Als Lösungsmittel wurde in der Regel deionisiertes Wasser verwendet.

<u>Acetatpuffer</u>	25 mM Natriumacetat, pH 4,6
<u>Alkylierungspuffer</u>	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat 5 mM Iodacetamid
<u>Ampicillin-Stocklösung</u>	50 mg/ml Ampicillin, sterilfiltrieren
<u>Blockierungspuffer</u> (Peptidsäule)	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl, pH 8,0
<u>Blockpuffer Western Blot</u>	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS-Puffer

<u>Blue-Silver-Färbelösung</u>	0,12% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250 10% (w/v) Ammoniumsulfat 10% (v/v) Phosphorsäure 20% (v/v) Methanol
<u>Carbonatpuffer (ELISA)</u>	15 mM Natriumcarbonat 15 mM Natriumhydrogencarbonat
<u>Chloramphenicol-Stocklösung</u>	34 mg/ml Chloramphenicol, sterilfiltrieren
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	0,125% (w/v) Coomassie Brillant Blue R250 45% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
<u>ELISA-Blockpuffer</u>	2% (w/v) BSA in Carbonatpuffer
<u>ELISA-Waschpuffer</u>	0,1% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS
<u>Entfärber</u>	9% (v/v) Ethanol 6% (v/v) Essigsäure
<u>ESI-Puffer A</u>	5% (v/v) Acetonitril 0,1% (v/v) Ameisensäure
<u>ESI-Puffer B</u>	95% (v/v) Acetonitril 0,1% (v/v) Ameisensäure
<u>Extraktionspuffer</u>	1x Solubilisierungspuffer 2% (w/v) Triton X-100 2 mM CaCl ₂
<u>Fixierlösung Blue Silver</u>	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
<u>GST-Elutionspuffer</u>	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 50 mM reduziertes Glutathion
<u>IP-Waschpuffer</u>	1x Solubilisierungspuffer 1% (v/v) Triton X-100
<u>LB-Medium</u>	1,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) NaCl autoklavieren
<u>Lösung A</u>	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
<u>Lösung B</u>	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50% (v/v) Acetonitril

<u>Lysepuffer</u>	100 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM MgCl ₂
<u>MgCl₂/CaCl₂-Lösung</u>	80 mM MgCl ₂ 20 mM CaCl ₂ autoklavieren
<u>10x PBS-Puffer</u>	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
<u>Paraformaldehyd-Lösung</u>	4% (v/v) Paraformaldehyd in 1x PBS
<u>Peptidbindungspuffer</u>	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl, pH 8,3
<u>Proteaseinhibitor-Mix</u>	1,0 mg/ml (w/v) Leupeptin in H ₂ O deion, 1:500 verdünnen 1,0 mg/ml (w/v) Pepstatin in Isopropanol, 1:1000 17,4 mg/ml (w/v) PMSF in Ethanol, 1: 1000 verdünnen
<u>Ponceau-S-Lösung</u>	0,5% (w/v) Ponceau 1% (v/v) Essigsäure
<u>Puffer S1 (4°C)</u>	50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8 25 mM Tris-HCl, pH 8 autoklavieren
<u>Puffer S2</u>	0,2 N NaOH 1% (v/v) SDS
<u>Puffer S3 (4°C)</u>	3 M Kaliumacetat 11,5% (v/v) Essigsäure autoklavieren 20 µg/ml RNase
<u>Reduktionslösung</u>	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat 10 mM Dithiothreitol
<u>Regenerationspuffer A</u>	8 M Harnstoff 1% (w/v) SDS 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol
<u>Regenerationspuffer B</u>	50% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure

<u>RIPA-Puffer</u>	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 % (v/v) Nonidet P40 0,1 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat
<u>Saccharose-Puffer</u>	250 mM Saccharose 10 mM Tris/HCl, pH 7,4
<u>4x Sammelgelpuffer pH 6,8</u>	0,5 M Tris HCl 0,4 % (w/v) SDS
<u>10 x SDS- Elektrophoresepuffer</u>	0,25 M Tris HCl, pH 8,3 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
<u>2x SDS- Ladepuffer/Probepuffer</u>	120 mM Tris HCl, pH 6,8 8 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
<u>5x Solubilisierungspuffer</u>	100 mM Hepes 750 mM NaCl pH 7,5
<u>"Stripping"-Puffer</u>	62,5 mM Tris HCl, pH 6,8 2% (w/v) SDS 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol
<u>50x TAE-Puffer</u>	2 M Tris 0,05 M Na ₂ -EDTA pH 8.0 5,71% (v/v) konzentrierte Essigsäure
<u>10x TBS-Puffer</u>	0,5 M Tris/HCl, pH 8,0 1,5 M NaCl
<u>TBST-Puffer</u>	0,1% (v/v) Tween 20 in 1x TBS-Puffer
<u>TCT-Puffer</u>	0,7% (w/v) λ -Carageen 0,5% (v/v) Triton X-100 in 1x TBS, pH 7,4
<u>4 x Trenngelpuffer pH 8,8</u>	1,5 M Tris HCl 0,4% SDS (w/v)
<u>Transferpuffer</u>	1 x SDS-Elektrophoresepuffer 20% (v/v) Methanol

2.4 DNA- und Proteinmarker

Tabelle 4: Liste der verwendeten Protein und DNA-Marker mit ihren Herstellern und den enthaltenen Markerbanden. Bei den Proteinmarkern sind die Angaben der Bandengröße in kDa, beim DNA-Marker in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Größe der einzelnen Banden kann je nach Charge geringfügig variieren. Fette Zahlen sind in dem Marker besonders hervorgehoben, z.B. durch andere Färbung bzw. stärkere Banden.

Name	Hersteller	Markerbanden
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot	170; 130; 95 ; 72; 55; 43; 34; 26; 17; 10 [kDa]
PeqGOLD Proteinmarker I	peqlab, Erlangen	116; 66; 55; 45; 35; 25; 18,2; 14,4 [kDa]
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot	117; 90; 49; 35; 26; 19 [kDa]
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot	10.000; 8.000; 6.000; 5.000; 4.000; 3.500; 3.000 ; 2.500; 2.000; 1.500; 1.200; 1.000 ; 900; 800; 700; 600; 500 ; 400; 300; 200; 100 [bp]

2.5 Verwendete Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Tabelle 5: Liste der in der Arbeit verwendeten Primärantikörper. Ein zusätzlicher Cysteinrest (C) am N-Terminus von Epitopsequenzen gibt an, dass über diese Aminosäure das KLH (keyhole limpet haemocyanin) zur Immunisierung an das Peptid gekoppelt wurde.

Antigen / Name	Epitop	Wirtstier/ AK-Typ	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller; Produktnummer
hTRPV5 / 981	(C)GLNLSEGDGEEVYHF (AS 715-729)	Kaninchen polyklonal	WB: 10-15 µg/ml IHC: 100-200 µg/ml	AG Fecher-Trost
hTRPV5 / 1052	(C)TASQSSSHRGWEILRQ AS 691-706	Kaninchen polyklonal	WB: 15 µg/ml IHC: 100µg/ml	AG Fecher-Trost
hTRPV5 / 1074	(C)EELSFLLELVSSDKR (AS 288-302)	Kaninchen polyklonal	WB: 15 µg/ml IHC: 100µg/ml	AG Fecher-Trost
hTRPV5 / 1075	(C)EVFKNSDKEDDQEHP (AS 649-663)	Kaninchen polyklonal	WB: 15 µg/ml IHC: 100µg/ml	AG Fecher-Trost
hTRPV5 / Alomone	AS 715-729	Kaninchen polyklonal	4µg/ml	Alomone labs, Israel; ACC-035
hTRPV5 / H-99	AS 631-729	Kaninchen polyklonal	4µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg; sc-30186
CaT-2	20 AS im C-Terminus	Kaninchen polyklonal	5 µg/ml	AlphaDiagnostic, San Antonia; CAT21-S
hTRPV6 / 429	(C)RGDLEDGESWEYQI (AS 713-725)	Kaninchen polyklonal	10 µg/ml	Daniela Hirnet [Hirnet et al., 2003]

hTRPV6 / 981	(C)RGDLEDGESWEYQI (AS 713-725)	Kaninchen polyklonal, ungereinigtes Serum		AG-Fecher-Trost
hTRPV6 / 26B3	LGCPFSPHLSLP (AS 669-680)	Maus monoklonal	5 µg/ml	Daniela Hirnet [Hirnet et al., 2003]
humane Alkalische Phosphatase der Placenta / PLAP	/	Maus monoklonal (Klon 8B6)	1:1000 (nur IHC)	Sigma-Aldrich, München; A-2951
humanes Cytokeratin 7 / CK7	/	Maus monoklonal	gebrauchsfertige Lösung für IHC	BioLogo, Kronshagen; CK107
Calpain-6	/	Ziege polyklonal	1 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg; sc-54710
Ku-70	/	Maus monoklonal	1 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg; sc-56129
11β-HSD2	/	Kaninchen polyklonal	1 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg; sc-20176

2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper, sowohl für Western Blots (HRP) als auch die Immunhistochemie (Alexa)

Name, gekoppelte Gruppe	Typ	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller; Produktnummer
Anti-rabbit HRP	IgGs species-specific F(ab') ₂ fragment	Esel	1:25.000 - 1:50.000	GE Healthcare, München NA9340
Anti-rabbit-LC HRP	IgGs, light chain specific	Maus (monoklonal)	1:30.000	Dianova, Hamburg 211-032-171
Anti-Maus HRP	IgGs (H+L)	Ziege	1:30.000	Dianova, Hamburg; 115-035-146
Anti-goat HRP	IgGs (H+L)	Kaninchen	1:10.000	Santa Cruz, Heidelberg sc-2020
Anti-rabbit- Alexa488	IgGs (H+L)	Ziege	1:200	Invitrogen, Karlsruhe; A-11008
Anti-rabbit- Alexa594	IgGs	Ziege	1:200	Invitrogen, Karlsruhe; A-11012
Anti-Maus- Alexa488	IgGs	Ziege	1:200	Invitrogen, Karlsruhe; A-11001
Anti-Maus Alexa594	IgGs	Ziege	1:200	Invitrogen, Karlsruhe; A-11005

2.6 DNA-Vektoren

pJET1.2/blunt Cloning Vektor (Fermentas, St-Leon-Rot): Der Vektor ist 2974 Basenpaare groß und trägt ein Ampicillinresistenzgen. Der gelieferte Vektor wurde innerhalb der multiplen Klonierungsstelle mit *EcoRV* geschnitten und liegt bereits linearisiert vor, so dass DNA-Fragmente mit glatten Enden direkt aufgenommen werden können.

pGEX-4T-2 Vektor (GE Healthcare, München): Der 4970 bp große Vektor trägt neben einem Ampicillin-Resistenzgen auch eine cDNA für die Glutathion-S-Transferase (GST), die direkt N-Terminal vor der multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) liegt, mit einer Thrombinschnittstelle dazwischen. Nach Ligation werden die entstehenden Proteine als Fusionsproteine, bestehend aus einem N-terminalen GST und dem darauffolgenden Protein, dessen cDNA in die MCS eingebaut wurde, exprimiert. Durch die vorhandene Thrombin-Schnittstelle ist es möglich, den GST-Anhang zu entfernen.

2.7 Kompetente Bakterienstämme

E.coli BL21pLysS (Stratagene, Amsterdam, NL): Ein proteasedefizienter Bakterienstamm mit Chloramphenicol-Resistenz, der besonders zur heterologen Proteinexpression geeignet ist.

Genotyp: *E.coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *gal λ*(DE3) [pLysS Cam^r]

E.coli XL1blue (Stratagene Amsterdam, NL): Ein Bakterienstamm mit Tetracyclin-Resistenz, der sich besonders zur Plasmidpropagation eignet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' proAB lacI ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

2.8 Klonierungsprimer

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer für die Klonierung der N-terminalen TRPV5-Fusionsproteine. Alle sense-Primer (for) fügen eine *Bam*HI-Schnittstelle ein und die antisense-Primer (rev) jeweils eine *Not*I-Schnittstelle. Die Sequenzen beziehen sich auf das humane Gen.

Primername	Sequenz	TRPV5-Fusionsprotein
for V5 AS1	5'-CG GGATCC ATG GGG GGT TTT CTA CCT AA-3'	N1; N3; N7
for V5 AS81	5'-CG GGATCC ACG GCG CTG CAC ATA GCA-3'	N4
for V5 AS152	5'-CG GGATCC TTC CGC CGT AGT CCC CG-3'	N2;N5
for V5 AS230	5'-CG GGATCC CAG CCC CTG GAC CTT GTG-3'	N6
rev V5 AS100	5'-GC GCGGCCGC TCA CTC CAT CAG CAC CAA GGC-3'	N2
rev V5 AS171	5'-GC GCGGCCGC TCA GGC AGC AAA GGA CAA AGG G-3'	N1; N4
rev V5 AS 250	5'-GC GCGGCCGC TCA CTC CAC TCC AGC CAG CTT-3'	N5
rev V5 AS330	5'-GC GCGGCCGC TCA GCA GAA GTA CGG CCG GC-3'	N2; N6; N7

Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer für die Klonierung der C-terminalen TRPV5-Fusionsproteine. Alle sense-Primer (for) fügen eine *Bam*HI-Schnittstelle ein und die antisense-Primer (rev) jeweils eine *Not*I-Schnittstelle. Die Sequenzen beziehen sich auf das Mausgen.

Primername	Sequenz	TRPV5-Fusionsprotein
for mV5 AS571	5'-CG GGATCC ATG GGC GAC ACT CAC TGG-3'	C1; C4
for mV5 AS601	5'-CG GGATCC ATG CCT CGT TTC CTG TGG C-3'	C2
for mV5 AS663	5'-CG GGATCC GGG ACT GAG ACT GGG ACT-3'	C3
rev mV5 AS608	5'-GC GCGGCCGC TCA GCG AGG CCA CAG GAA ACG-3'	C1
rev mV5 AS662	5'-GC GCGGCCGC TCA AGA AGG TTG TTT CTC AGA TAG-3'	C2
rev mV5 AS723	5'-GC GCGGCCGC TCA GAA CTG GTA GAT CTC TTC-3'	C3;C4

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaktion, PCR) ist eine enzymatische Methode, mit der geringe Mengen an DNA exponentiell vervielfältigt werden [Mullis et al., 1986]. Sie besteht aus einem dreistufigen Prozess, der in 25-35 Zyklen wiederholt wird. Im ersten Schritt wird die DNA-Matrize zu Einzelsträngen denaturiert so dass im zweiten Schritt die Oligonukleotide (Primer) hybridisieren können ("Annealing"). Die "Annealing"-Temperatur ist dabei abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die beiden Primer definieren den spezifischen DNA-Bereich, der amplifiziert wird und bilden den Startpunkt für die DNA-Polymerase. Durch diese wird im letzten Schritt (Elongation) eine zur Matrize komplementäre DNA-Sequenz polymerisiert. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide enthält zusätzlich jeweils am 5'-Ende die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym, so dass jedes neu synthetisierte DNA-Fragment automatisch von Restriktionsschnittstellen flankiert wird. Die für die Reaktion verwendete thermostabile *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) stammt ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und hat laut Herstellerangaben eine Fehlerrate von $2,2 \times 10^{-5}$ pro Nukleotid pro Zyklus. Als DNA-Matrize dient die N-terminale cDNA-Sequenz des humanen TRPV5 Gens im pCMVsport-Vektor (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH Berlin, Klon ID: HU3.p983C04357D2; Library Human Unigene Set - RZPD 3.1) bzw. die Maus TRPV5-cDNA im Vektor pcDNA3 (PD Dr. Ulrich Wissenbach, Pharmakologie, Universität des Saarlandes).

Zur Durchführung der PCR werden folgende Komponenten zusammengemischt:

10 x PCR-Puffer	5 μ l
25 mM MgCl ₂	3 μ l
Primer (vorwärts)	5 μ l
Primer (rückwärts)	5 μ l
dNTP Mix (je 10mM)	1 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 μ l
DNA-Matrize [0,14 μ g/ μ l]	1,4 μ l
mit H ₂ O _{ddest} auf 50 μ l auffüllen	

Die PCR-Reaktion wird nach folgendem Programm durchgeführt:

	98 °C	1:30 min	Denaturierung	
30 x	{	94 °C	1 min	Denaturierung
		53 °C	1 min	"Annealing"
		72 °C	1 min	Elongation
	72 °C	10 min	Elongation	
	4 °C	∞		

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Kompetenz beschreibt die Fähigkeit von Bakterienzellen, frei in der Umgebung vorkommende DNA aufzunehmen, was man sich bei der Transformation von Bakterien (3.1.6) zu nutze macht. *E. coli* Zellen besitzen keine natürliche Transformationskompetenz und müssen deshalb durch eine chemische Methode künstlich kompetent gemacht werden. Durch eine Kalziumchlorid-Behandlung nach dem Protokoll von Sambrook et al. [Sambrook et al., 1989] werden die Bakterien befähigt, zirkuläre Plasmid-DNA aufzunehmen. Dazu wird mit einem sterilen Zahnstocher eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte gepickt und damit eine 5 ml LB-Vorkultur angeimpft, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wird. Von dieser Übernachtkultur werden anschließend 100 µl verwendet, um 100 ml LB-Medium anzupflanzen. Diese Kultur wird inkubiert bis die optische Dichte (OD) bei 600 nm einen Wert von 0,35-0,4 erreicht. Anschließend wird die Bakteriensuspension in zwei sterile, vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für etwa 10 Minuten auf Eis gelagert, um sie auf 0 °C abzukühlen, bevor die Bakterien bei 3000xg (4 °C) 10 Minuten pelletiert werden. Der Überstand wird verworfen und jedes Pellet in 30 ml einer eiskalten MgCl₂/CaCl₂-Lösung resuspendiert. Daraufhin werden die Bakterien erneut wie oben abzentrifugiert und die Pellets in je 2 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ gelöst und vereinigt. Um die Bakterien für die spätere Lagerung bei -80 °C vorzubereiten, werden 140 µl DMSO zugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden erneut 140 µl DMSO zugegeben und die nun kompetenten Zellen in kleinen Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Um zu überprüfen, ob die Behandlung erfolgreich war, wird eine Testtransformation (3.1.6) mit einem beliebigen Plasmid mit Antibiotikaresistenz-Gen durchgeführt und kontrolliert, ob die Bakterien auf Antibiotika-haltigem Medium wachsen.

3.1.3 Herstellung von Agar-Selektionsplatten

Zur Herstellung der Agar-Platten werden 15 g Bacto-Agar in 1 Liter LB-Medium gelöst und autoklaviert. Vor dem Gießen werden die Antibiotika (Ampicillin: 50 µg/ml; Chloramphenicol: 34 µg/ml) zugegeben. Auf diesen Platten können dann nur solche Bakterien wachsen, die ein Plasmid aufgenommen haben, da die *E. coli* Bakterien nur eine Resistenz gegen Chloramphenicol enthalten. Auf dem eingeschleusten Plasmid ist zusätzlich ein Resistenzgen gegen Ampicillin vorhanden, so dass nur transformierten Bakterien wachsen können.

3.1.4 Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Kontrolle, ob die aus Bakterien isolierten Plasmide nach der Klonierung ein korrektes Insert enthalten, wird eine Restriktionsanalyse durchgeführt, bei der entweder das Insert ausgeschnitten oder innerhalb des Plasmids mit einem anderen Restriktionsenzym geschnitten wird. Das Schneiden erfolgt über Restriktionsendonukleasen, welche Enzyme sind, die DNA an bestimmten Sequenzabschnitten (Erkennungssequenz) im doppelsträngigen Phosphatrückgrat spalten. Die Enzyme erzeugen je nach Typ entweder Fragmente mit stumpfen Enden ("blunt ends") oder bei anderen steht ein Einzelstrang am Ende des Fragments etwas über ("sticky ends"), wobei die Sequenz je nach Restriktionsenzym variiert. Über die während der PCR (3.1.1) eingeführten Schnittstellen für *Bam*HI und *Not*I wird später das Insert mit den entsprechenden Enzymen aus dem Plasmid ausgeschnitten. Zum Kontrollverdau wird der verwendete pGEX Vektor zum Teil auch alternativ mit dem Restriktionsenzym *Apa*I verdaut. Je nachdem, ob die restringierte DNA für eine spätere Isolation aus dem Agarosegel (3.1.10) verwendet (quantitativer Verdau), oder nur zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen werden soll (Kontrollverdau), werden unterschiedliche Mengen an DNA eingesetzt.

Die Ansätze setzen sich wie folgt zusammen:

<i>Quantitativer Verdau:</i>	10x <i>Bam</i> HI-Puffer	2,5 µl
	<i>Bam</i> HI	1,5 µl
	<i>Not</i> I	1,5 µl
	Plasmid DNA	15,0 µl
	H ₂ O _{ddest}	<u>4,5 µl</u>
		25 µl

<i>Kontrollverdau:</i>	<u><i>Bam</i>HI+ <i>Not</i>I</u>	<u><i>Apa</i>I</u>
10x <i>Bam</i> HI-Puffer	1 μ l	---
10x Puffer (blau)	---	1 μ l
<i>Bam</i> HI	0,8 μ l	---
<i>Not</i> I	0,8 μ l	---
<i>Apa</i> I	---	1 μ l
Plasmid-DNA	2 μ l	2 μ l
H ₂ O _{ddest}	5,4 μ l	6 μ l
	<u>10 μl</u>	<u>10 μl</u>

Die Ansätze werden für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 6x DNA-Laufpuffer versetzt und auf ein 1,2%-iges Agarose-Gel (3.1.9) aufgetragen.

3.1.5 DNA-Ligationen

Die Ligation dient der enzymatischen Verknüpfung zweier DNA-Fragmente mit Hilfe einer Ligase. Dieses Enzym verknüpft ein freies 3'-Hydroxy-Ende mit einem 5'-Phosphat-Ende der beiden DNAs. Das Ziel ist dabei, ein bestimmtes DNA-Fragment mit einem Vektor zu verknüpfen, um das resultierende Plasmid später in Bakterien zu exprimieren. Die beiden DNA Fragmente müssen dazu in linearisierter Form vorliegen, was entweder durch einen vorherigen Restriktionsverdau (3.1.4) oder durch die Verwendung eines PCR-Produkts erreicht wird.

3.1.5.1 Ligation von PCR Produkten mit dem Vektor pJET ("Blunt-end"-Ligation)

Die bei der PCR entstandenen Produkte (3.1.1) werden mit Hilfe des "CloneJET™ PCR Cloning Kit" (Fermentas, St-Leon-Rot) nach den Herstellerangaben in den Vektor "pJET1.2/blunt Cloning Vector" inkloniert. Dazu werden erst die 3'-Überhänge, die die *Taq*-DNA-Polymerase bei der PCR anfügt mit dem entsprechenden "DNA Blunting Enzym" aufgefüllt. Dadurch entstehen PCR-Produkte mit glatten Enden, über die das PCR Produkt in den genannten Vektor eingebaut wird.

Die Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

2x Reaktionspuffer	10 μ l
PCR-Produkt	1,5 μ l
H ₂ O (nukleasefrei)	4,5 μ l
"DNA Blunting Enzyme"	<u>1,0 μl</u>
	18 μ l

Dieser Ansatz wird für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend jeweils 1 µl Vektor pJET1.2/blunt [50 ng/µl] und T4 DNA Ligase (5 u/µl) zugegeben. Nach einer Inkubation für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur wird die ligierte DNA in Bakterien (*E.coli* XL1 blue) transformiert (3.1.6) und der Einbau des Inserts nach einer Plasmidisolation (3.1.7) mit einem Kontrollverdau durch Restriktionsenzyme (3.1.4) kontrolliert.

3.1.5.2 Ligation mit dem Vektor pGEX ("sticky-end"-Ligation)

Nachdem die PCR-Produkte zuerst in den Vektor pJET1.2/blunt inkloniert wurden, werden sie dort mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I ausgeschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt (3.1.9) und anschließend daraus isoliert (3.1.10). Diese isolierten DNA Fragmente enthalten an ihrem 5'-Ende eine *Bam*HI und am 3'-Ende eine *Not*I Schnittstelle, über die sie gerichtet in den Vektor pGEX 4T-2 (GE Healthcare, München) ligiert werden. Der Vektor wird zuvor ebenfalls mit den beiden gleichen Restriktionsenzymen geschnitten.

Die Ligation setzt sich wie folgt zusammen:

pGEX 2T DNA [37 ng/µl]	1 µl
Insert DNA	1 µl
10x Ligase-Puffer	1 µl
DNA-Ligase	1 µl
ATP [1 µg/µl]	1,5 µl
H ₂ O	<u>4,5 µl</u>
	10,0 µl

Der Ligationsansatz wird für 72 Stunden bei 4 °C inkubiert und anschließend in Bakterien transformiert (3.1.6).

3.1.6 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die stabile genetische Veränderung von Bakterien, wobei Fremd-DNA eingeschleust wird und dann in Form extrachromosomaler DNA (Plasmide) vorliegt. Die Transformation wird verwendet, um den Erfolg einer Ligation zu überprüfen, oder Fusionsproteine in Bakterien zu exprimieren. Da für die Transformation *E. coli* Bakterien verwendet werden, die zu den gram-negativen Bakterien gehören und keine DNA selbständig aufnehmen können, müssen speziell behandelte, so genannte kompetente Zellen verwendet werden (3.1.2). Die Transformation der Bakterien wird nach Sambrook et al.

[Sambrook et al., 1989] durchgeführt. Dazu werden 50-100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und 1 µg des zu transformierenden Plasmids zugegeben bzw. die Hälfte eines Ligationsansatzes (5 µl). Daraufhin erfolgt für 20-30 Minuten eine Inkubation auf Eis. Die Aufnahme des Plasmids in die Bakterien wird durch einen Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C und eine direkte Zugabe von 400 µl LB-Medium ohne Antibiotika erreicht. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis (2 Min) wird die Bakteriensuspension für eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm im Heizblock geschüttelt. Einmal 100 µl und einmal der Rest dieser Zellsuspension werden nun auf Agar-Selektionsplatten ausplattiert und für 16-24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.7 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Vorbereitung der Isolation von Plasmid-DNA aus den Bakterien zu analytischen Zwecken werden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie der transformierten Bakterien (3.1.6) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) angezogen. Am nächsten morgen wird 1 ml der angewachsenen Bakteriensuspension abzentrifugiert (3 Min, 14000xg, RT). Zur Isolation der DNA wird das Prinzip der alkalischen Lyse verwendet. Dazu wird das Pellet erst in 100 µl Puffer S1 resuspendiert (vortexen) und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer S2 und mehrmaligem Invertieren mit anschließender Inkubation für 5 Minuten auf Eis kommt es zur alkalischen Lyse. Der Puffer enthält sowohl SDS, um die Zelle aufzuschließen, als auch NaOH, welches den pH-Wert in den stark alkalischen Bereich verschiebt. Durch die pH-Wert Verschiebung wird sowohl die chromosomale, als auch die extrachromosomale DNA denaturiert. Die chromosomale DNA kann allerdings im Gegensatz zur kleineren Plasmid-DNA nach Neutralisations des pH-Wertes durch Kaliumacetat und Essigsäure (Zugabe von 150 µl Puffer S3 und mehrmaliges Invertieren) nicht renaturieren und fällt während der Inkubationszeit von 10 Min auf Eis aus. Zusammen mit dem ebenfalls durch die Neutralisierung ausgefallenen NaOH wird die chromosomale DNA-Masse nun abzentrifugiert (10 Min, 14000xg, RT). Bei diesem Zentrifugationsschritt setzen sich ebenfalls Zellmembran- und Zellwandbestandteile, sowie Proteine als Pellet ab. Die renaturierte Plasmid-DNA wird mit der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die isolierte DNA zu reinigen und die restlichen Puffersubstanzen, vor allem Salze, zu entfernen wird sie aus dem Überstand durch Zugabe eines halben Volumens 100 % Isopropanol p.a. und einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur ausgefällt. Die DNA wird durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (25 Minuten, 14000xg, RT) pelletiert und das DNA-Pellet 2-mal mit ca. 400 µl eiskaltem

70 % Ethanol gewaschen (10 Minuten, 14000xg, RT). Nachdem die DNA an der Luft getrocknet wurde, wird sie in 30-50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddest}}$ gelöst und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder direkt für einen Restriktionsverdau (3.1.4) eingesetzt.

3.1.8 Quantitative Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um Plasmid-DNA in größerem Maßstab zu erhalten, wird die DNA mit Hilfe des "HiSpeed Plasmid Midi" Kit (Qiagen, Hilden) exakt nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Dazu wird wie beschrieben von einer einzelnen Bakterienkolonie eine 5 ml Kultur angeimpft und anschließend daraus die 100 ml Hauptkultur durch eine 1:500 Verdünnung angeimpft. Zur Fällung wird allerdings nicht wie im Handbuch angegeben der "QIAprecipitator Midi" verwendet, sondern nach der Fällung mit Isopropanol wird so weiter verfahren wie unter 3.1.7 beschrieben und die DNA in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddest}}$ resuspendiert.

3.1.9 Horizontale DNA-Agarosegelelektrophorese

Als Gelelektrophorese bezeichnet man die Wanderung elektrisch geladener Teilchen im Gleichstromfeld. Als Trägermedium wird ein Agarose-Gel verwendet, wobei die Laufgeschwindigkeit der zu trennenden DNA-Fragmente von der Größe abhängig ist, also der Masse und der Gestalt der wandernden Moleküle sowie deren Viskosität im Medium. Deshalb wandern kleine Moleküle rasch durch das Gel, während große Moleküle nahe der Probenauftragsstelle bleiben. Da DNA bei allen pH-Werten durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat negativ geladen ist, bewegt sie sich nach Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode. Zur Durchführung einer Gelelektrophorese wird zunächst ein 0,8-1,2 %iges Agarose-Gel gegossen. Um diese Agarose-Lösung zu erhalten, wird die jeweilige Menge an Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und entsprechend mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Die Suspension wird mehrmals aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst ist. Anschließend wird sie bis auf $60-65\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und mit Ethidiumbromid (5 μl einer 10 mg/ml Stammlösung pro 40 ml Gel) versetzt, bevor sie in eine abgedichtete Gelform gegossen wird. Die Schichtdicke beträgt ca. 0,5 cm. Zur Formung von Taschen, in welche die Proben eingefüllt werden, wird ein Kamm eingefügt. Das zugegebene Ethidiumbromid lagert sich als DNA-interkalierender Farbstoff zwischen die Basen der DNA ein, wodurch die aufgetrennte DNA durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) sichtbar wird. Nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in eine Horizontal-Gelapparatur mit TAE-Puffer überführt. In die Taschen wird die mit DNA-Probenpuffer

versetzte Probe auf der Kathodenseite einpipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 bis 200 mA und anschließend wird die DNA im Gel unter UV-Licht detektiert.

3.1.10 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA aus Agarosegelen ist notwendig, um nach einer Trennung von DNA-Gemischen nur die gewünschten Fragmente wiederzugewinnen, um sie für weitere Versuche, wie z.B. Ligationen, einzusetzen können. Die Durchführung erfolgt unter Verwendung des peqGOLD Gel Extraction Kits (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Durchführung der Extraktion erfolgt wie in der Arbeitsanleitung des Herstellers beschrieben und die Ausbeute wird anschließend über eine DNA-Konzentrationsbestimmung (3.1.11) bestimmt.

3.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts einer Probe und deren Reinheit erfolgt eine photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette. Bei 260 nm werden die Basen der DNA gemessen und für die Reinheitsbestimmung dient der Wert der 280 nm Messung, da hier das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste von Proteinen liegt. Eine Absorptionseinheit von 260 nm entspricht dabei 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml. Die Konzentration berechnet sich daraus wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption } 260 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor der Probe}$$

3.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte im Nano+Bio-Center an der TU Kaiserslautern. Zur Sequenzierung wurden die DNA mit den entsprechenden Primern zusammen abgeben und die Sequenzierung dort mit einem ABI 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI 3100) und einem 50 cm Kapillarsystem durchgeführt. Die Sequenz wurde mit der Software "genedoc" ausgewertet und die entsprechenden Chromatogramme bei Bedarf mit der Software "Chromas" analysiert.

3.1.13 Anlegen von Glycerindauerstocks

Um transformierte und bereits in Flüssigkultur angewachsene Bakterien über einen längeren Zeitraum zu lagern, werden Dauerstocks angelegt. Dazu wird eine Bakterienkultur über mehrere Stunden frisch angezogen und auf Eis abgekühlt. 800 µl der Suspension werden mit 200 µl autoklaviertem wasserfreiem Glycerin vermischt. Durch das Glycerin ist es möglich, die Bakterien bei -80 °C zu lagern, ohne dass die Suspension so stark einfriert, dass durch Kristallbildung die Zellwand zerstört wird.

3.2 Expression und Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

3.2.1 Expression der GST-Fusionsproteine in *E.coli*

Um die GST-Fusionsproteine in Bakterien zu exprimieren, wird als Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet, der zusätzlich das pLysS Plasmid trägt. Da die T7 RNA Polymerase, die für die Expression der Proteine verantwortlich ist, in BL21(DE3) Zellen eine sehr hohe Aktivität aufweist, ist dieser besonders für die Expression rekombinanter Proteine geeignet. Allerdings kommt es dadurch auch zu einer Hintergrundexpression des gewünschten Gens in nicht-induzierten Zellen. Dieses zusätzlich enthaltene pLysS Plasmid produziert aber eine größere Menge an T7 Lysozym, was die Hintergrundexpression heterologer Gene unterdrückt. Allerdings ist die Gesamtexpression an rekombinantem Protein geringer als in gewöhnlichen BL21(DE3) Zellen. Um rekombinante Proteine in diesen Bakterien zu exprimieren, wird das entsprechende Plasmid vorher in die Zelle transformiert (3.1.6). Das Plasmid beinhaltet dabei die DNA-Sequenz des gewünschten Proteins, die direkt C-terminal hinter die cDNA-Sequenz von GST kloniert wurde. Dadurch entsteht bei der Expression ein Tandem-Protein aus GST und dem eigentlichen Protein. Das GST dient dabei nur als Adapterprotein zur vereinfachten Aufreinigung (3.2.2). In den Zellen wird dann durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) Induktion die Expression der T7 RNA Polymerase gestartet, um die rekombinanten Proteine zu exprimieren. Dazu wird nach der Transformation eine kleine 5 ml Vorkultur aus LB-Medium mit den Antibiotika [Ampicillin (50 μ g/ml) für die Selektion transformierter Bakterien und Chloramphenicol (34 μ g/ml)] für die Selektion des pLysS-Stammes angesetzt. Diese wird anschließend mit einer Einzelkolonie, die mit einem sterilen Zahnstocher gepickt wurde, angeimpft. Alternativ können auch 10 μ l eines Glycerindauerstocks verwendet werden. Diese Kultur wird über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wird mit 1 ml dieser Übernacht-Kultur eine große Vorkultur in einem Erlenmeyerkolben mit 40 ml LB-Medium (+ entsprechende Antibiotika) beimpft und ebenfalls über Nacht inkubiert. Mit 20-25 ml dieser großen Vorkultur wird die eigentliche Kultur (400 ml LB-Medium + Antibiotika + 0,4 % Glucose) angeimpft, die zur Proteinexpression verwendet wird. Diese Großkultur wird in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert und nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7-1,0 wird die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG gestartet. Vorher wird noch 1 ml der Kultur entnommen, was später als Kontrolle der Expression vor Induktion dient. Diese Probe wird 3 Minuten bei 14.000xg in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend das Pellet direkt in 150 μ l 2x SDS-Ladepuffer resuspendiert. Währenddessen wird die Bakterienkultur nach der Induktion bei 29 °C für 2-4 Stunden weiter inkubiert.

Durch die Temperaturniedrigung wird nicht nur das Wachstum der Bakterien herabgesetzt, sondern auch die Proteinexpression verringert, was verhindern soll, dass die gebildeten Proteine aufgrund zu großer Mengen in so genannten Einschlusskörperchen ("Inclusion bodies") ausfallen. Bei Testexpressionen wird zur späteren Kontrolle der Proteinexpression jede Stunde eine Probe von 1 ml entnommen und wie bei der Probe vor Induktion beschrieben verfahren. Um die exprimierten Proteine später aus den Bakterien aufzureinigen, wird am Ende der Inkubationszeit die Kultur abzentrifugiert (15 Min bei 4 °C und 3.000xg, Zentrifuge RC5B, Sorvall). Das erhaltene Bakterienpellet wird bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.2 Isolation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien

Zur Aufreinigung der in 3.2.1 exprimierten rekombinanten GST-Fusionsproteine wird das erhaltene Pellet in 15 ml 1x TBS-Puffer (+ Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert und in ein großes Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufschluss der Bakterien und Freisetzung der exprimierten Proteine wird die Suspension mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Bandelin electronic, Berlin) fünf Mal für 30 Sekunden (20 %) sonifiziert. Anschließend wird das Lysat zusätzlich mit 2 % Triton X-100 versetzt, welches ebenfalls noch bestehende Zellmembranen zerstört und Proteine freisetzt. Dazu wird das Lysat 45 Minuten bis 1 Stunde bei 4 °C gerührt bevor die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 Min bei 4°C, 13.700xg) aus dem Lysat entfernt werden. Der daraus resultierende Überstand (Proteinextrakt) wird nach Filtration auf eine mit 1x TBS äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule (2 ml Säulenmaterial) gegeben und mindestens 2 Stunden bei 4 °C im Kreis über die Säule gepumpt. Während dieser Zeit bindet das aufzureinigende Fusionsprotein über seinen GST-Anteil an das Glutathion der Säule. Anschließend werden ungebundene Proteine mit 1x TBS-Puffer (+ Proteaseinhibitormix) so lange von der Säule gewaschen, bis eine Reaktion des Waschpuffers mit Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce, Rockfort, Illinois) keine Blaufärbung mehr zeigt bzw. die gleiche Farbe wie reines 1x TBS aufweist. Hierzu werden Waschpuffer und Reagenz 1:1 in einer Mikrotiterplatte gemischt. Das gewaschene Säulenmaterial wird entweder direkt für einen Pulldownversuch (3.6) eingesetzt oder in kleineren Aliquots (200 µl) eingefroren. Alternativ werden die Proteine mit freiem reduziertem Glutathion (Applichem, Darmstadt) von der Säule eluiert, wozu 1 ml des GST-Elutionspuffers auf die Säule gegeben und gemischt wird. Nach Inkubation für 2-3 Minuten wird das Eluat aus der Säule aufgefangen. Der Elutionsschritt wird je nach Protein 5-7 Mal wiederholt. Die erhaltenen Fraktionen werden nun in

Ultrafiltrationsröhrchen (Vivaspin; Sartorius, Göttingen) mit der entsprechenden Ausschlussgröße in 1x TBS umgepuffert und gleichzeitig auf etwa 1 ml eingengt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Mikrosomenpräparationen

Mikrosomen sind kleine Vesikel (Durchmesser ~100 nm) die von einer Membran, meistens der des glatten und rauhen endoplasmatischen Retikulums umschlossen werden. Die Präparation von Mikrosomen aus Geweben macht man sich zu Nutze, um die Membranproteine einer Zelle anzureichern. Bei einer Homogenisierung der Zellen wird die Zellmembran zerstört und die entstehenden Fragmente lagern sich spontan aufgrund ihrer Hydrophobizität zu kleinen Vesikeln, den Mikrosomen zusammen. Diese enthalten auch die in der Membran eingelagerten Proteine. Durch bestimmte Zentrifugationsschritte werden diese Mikrosomen von anderen Zellbestandteilen, wie den Kernen oder dem Zytoplasma getrennt.

3.3.1.1 Mikrosomenpräparation aus humaner Plazenta

Die Mikrosomenpräparation aus Plazenta erfolgt nach dem Protokoll von Jimenez et al. [Jimenez et al., 2004]. Die humane Plazenta wird unmittelbar nach dem Kaiserschnitt von normalen Schwangerschaften aus umliegenden Krankenhäusern auf Eis ins Labor transportiert. Alle folgenden Schritte werden bei 4 °C durchgeführt. 100 g Gewebe werden in drei Volumen (300 ml) Saccharose-Puffer (+ Proteaseinhibitormix) in einem Mixer mit niedriger Geschwindigkeit homogenisiert (3 Mal für 10 Sekunden mit einminütiger Unterbrechung). Das Homogenat wird für 15 Minuten bei 3000xg zentrifugiert. Bei dieser Niederzentrifugation werden schwere Zellbestandteile wie Zellkerne, andere Organellen und nicht aufgeschlossene Zellen von den leichten Bestandteilen wie Zytosol und Membranfragmenten abgetrennt. Der Überstand, der unter anderem die Mikrosomen enthält, wird zur weiteren Verwendung aufgehoben und das Pellet in 300 ml Saccharose-Puffer resuspendiert und anschließend wie oben zentrifugiert. In den gesammelten Überständen werden anschließend durch Ultrazentrifugation (L8-70M Ultrazentrifuge, Beckman Instruments) bei 100.000xg (45 Minuten, 4 °C) die Membranen von der zytosolischen Fraktion getrennt. Die Mikrosomen, die im Pellet enthalten sind, werden in 12-15 ml Saccharose-Puffer resuspendiert und durch Pottern homogenisiert. Die mikrosomale Fraktion

wird bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und die enthaltene Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode (3.3.3) bestimmt.

3.3.1.2 Mikrosomenpräparation aus Rattengeweben

Die Präparation der mikrosomalen Membranfraktion aus Rattengewebe erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie bei der Plazenta. Nach dem die einzelnen Gewebe aus einer 20 Tage alten Ratte präpariert wurden, werden sie gewogen, mit dem Skalpell zerkleinert und pro 500 mg Gewebe 7 ml Lysepuffer (+ Proteaseinhibitoren) verwendet. Das Gewebe wird im Puffer mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 20 Minuten eingefroren, um durch den Frier-Tau-Zyklus weitere Zellmembranen aufzuschließen (Frier-Tau-Lyse). Nach dem Auftauen in Wasser bei Raumtemperatur wird das Lysat in einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Zum Scheren des Lysats wird es durch eine Kanüle gepresst und pro 3,5 ml Gewebeextrakt 17,5 ml Saccharose-Puffer zugegeben. Durch eine Niedrigzentrifugation ($3000\times g$, 15 Minuten, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) werden die größeren Zellbestandteile pelletiert und aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation ($100.000\times g$, 45 Minuten, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) die mikrosomale Fraktion gewonnen. Das Pellet der Ultrazentrifugation wird in 200-400 μl (je nach Größe) Saccharose-Puffer gelöst und in einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Proteinkonzentration wird mit Hilfe der BCA-Methode (3.3.3) bestimmt.

3.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Maus-Niere

Anstelle einer Präparation der mikrosomalen Fraktion, wird aus diesem Gewebe ein Extrakt oder Homogenat hergestellt, indem zusätzlich auch zytosolische Proteine enthalten sind. Zur Herstellung dieses Extraktes aus Nieren von Mäusen wird das gleiche Protokoll angewendet, wie bei der Präparation von Mikrosomen aus Rattengeweben (3.3.1.2) mit kleinen Abweichungen. Pro 400 mg Gewebe werden 5 ml Lysepuffer (+ Proteaseinhibitormix) eingesetzt. Das Gewebe wird wie oben beschrieben im Ultraturax zerkleinert und für 20 Minuten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das aufgetaute Pellet wird mit dem Glas-Teflon-Potter homogenisiert und anschließend durch eine größere (0,9G) und eine kleinere (0,4G) Kanüle geschert. Im Anschluss daran wird das Homogenat nur noch 10 Minuten bei $2000\times g$ zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und größere Zelltrümmer zu entfernen. Die Proteinkonzentration des Extrakts im Überstand wird mit der BCA-Methode (3.3.3) bestimmt und der Extrakt bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach der BCA-Methode

Die Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen wurde nach einem Protokoll von Smith [Smith et al., 1985] modifiziert. Das Prinzip der Reaktion beruht darauf, dass die Peptidbindungen von Proteinen im wässrig alkalischen Milieu mit zweiwertigen Kupferionen einen Komplex eingehen. Bei Oxidation der Peptidbindung werden die Kupferionen reduziert und diese entstehenden einwertigen Kupferionen bilden mit je zwei Molekülen BCA (Bichinolin-diCarbonic Acid) einen wasserlöslichen Komplex. Die Intensität des violetten Farbstoffs ist dabei proportional zur Proteinmenge und wird über eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz werden BSA-Standards mit bekannter Proteinkonzentration (0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 µg/µl) eingesetzt. Die zu untersuchenden Proteingemische werden in verschiedenen Verdünnungen (1:250; 1:500; 1:1000; 1:2500; 1:5000) angesetzt und anschließend 50 µl von jeder Verdünnung und dem Standard (jeweils in Doppelansätzen) mit 300 µl des BCA-Reagenzes (gemischt nach Anleitung des Herstellers; Pierce) versetzt. Nach einer Inkubation für 45 Minuten bei 60 °C im Wasserbad werden 300 µl von jedem Ansatz in eine Mikrotiterplatte pipettiert und im Mikrotiterplattenphotometer bei 562 nm (Multiscan EX, ThermoScientific) gemessen. Die Erstellung der Eichgeraden und Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgt mit der Software "Ascent" (Version 3.6, Thermo Labsystems).

3.3.4 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Fällung von Proteinen mit TCA ist eine häufig angewendete Methode, um Proteine aus Lösungen aufzukonzentrieren. Hierbei werden die Proteine allerdings durch die starke Säure denaturiert. Eine eiskalte 40%-ige TCA-Stocklösung und die zu fällende Proteinlösung werden 1:1 gemischt, so dass sich eine Endkonzentration von 20% TCA ergibt. Nach dem Mischen wird die Probe 20 Minuten auf Eis inkubiert und dabei die Proteine aus der Lösung gefällt. Dieser Niederschlag wird dann abzentrifugiert (10 Min, 14.000xg, 4 °C) und das Pellet 2-mal mit dem 2-fachen Volumen Aceton (-20 °C) durch mischen und erneute Zentrifugation (10 Minuten, 14.000xg, 4 °C) gewaschen. Das Pellet wird anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 2x SDS-Ladepuffer gelöst.

3.3.5 Solubilisierung von Membranproteinen mit verschiedenen Detergenzien.

Um mit Membranproteinen zu arbeiten, müssen diese aus den Membranen gelöst (= solubilisiert) werden. Da die in der Membran liegenden Abschnitte hydrophoben Charakter besitzen, würden sie in der wässrigen Lösung eines normalen Puffers aggregieren. Deshalb

macht man sich die amphiphile Eigenschaft von Detergenzien zu nutze, die sowohl einen hydrophoben Teil, als auch einen hydrophilen Teil besitzen. Die hydrophoben Reste lagern sich an die hydrophoben Bereiche des Proteins an und verdrängen dabei die Phospholipide der Zellmembran. Dadurch können die Proteine im optimalen Fall aus der Membran gelöst werden und sind durch den hydrophilen Teil der Seife im Puffer löslich. Bei diesem Vorgang entstehen so genannte Mizellen, Komplexe aus Membranproteinen, Detergenz und Phospholipiden. Die Mizellen bilden sich erst bei einer bestimmten Detergenz-Konzentration aus, der kritisch mizellaren Konzentration (CMC), die für jede Seife spezifisch ist. Ebenso wird das optimale Massenverhältnis von Protein und Seife (SPV) berücksichtigt. Zur Solubilisierung wird die entsprechende Menge Detergenz im 1x Solubilisierungspuffer (+ Proteaseinhibitormix) gelöst und die Mikrosomen (3.3.1) zugegeben. Der Solubilisierungsansatz (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) wird im Glas-Teflon-Potter homogenisiert und dann für eine Stunde bei 4 °C gerührt. Die solubilisierten Membranproteine werden für 45 Minuten bei 100.000xg ultrazentrifugiert, um die restlichen Membranen abzutrennen und dann das Solubilisat im Überstand für weitere Versuche eingesetzt.

Tabelle 9: Zur Solubilisierung verwendete Detergenzien und deren Eigenschaften

Detergenz	CMC/ eingesetzte Konz.	Eingesetztes SPV	Ionische Eigenschaft	Solubilisierungsansatz
CHAPS	0.8% / 2%	1:1	zwitterionisch	20 mg Detergenz 20 mg Protein 200 µl 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 1 ml
Dodecyl-β-D- maltosid	0.01% / 1%	7:1	nicht ionisch	140 mg Detergenz 20 mg Protein 2.8 ml 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 14 ml
Nonidet-P40	(58 mM) / 1%	5:1	nicht ionisch	100 mg Detergenz 20 mg Protein 2 ml 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 10 ml
Octyl-β-D- glucosid	(18-20 mM) / 8%	0.8:1	nicht ionisch	320 mg Detergenz 20 mg Protein 800 µl 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 4 ml
Octyl-β-D- thioglucosid	0.2% / 2%	7:1	nicht ionisch	140 mg Detergenz 20 mg Protein 1.4 ml 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 7 ml

Thesit	0.006% / 2.5%	8:1	nicht ionisch	160 mg Detergenz 20 mg Protein 1.28 ml 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 6.4 ml
Triton X-100	0.02% / 2%	6:1	nicht ionisch	120 mg Detergenz 20 mg Protein 1.2 ml 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 6 ml
Tween-20	0.2% / 0.2%	1:10	nicht ionisch	2 mg Detergenz 20 mg Protein 200 µl 5x Solubilisierungspuffer H ₂ O ad 1 ml

3.3.6 Immunpräzipitation mittels Protein A- bzw. G-Agarose

Durch eine Immunpräzipitation werden spezifisch einzelne Proteine oder Proteinkomplexe aus einem Proteingemisch isoliert und angereichert. Des Weiteren ist es auch möglich Protein-Interaktionen zu untersuchen (Ko-Immunpräzipitation). Zur Präzipitation wird Protein A- (Roche Diagnostics, Mannheim) oder Protein G-Agarose (upstate, Charlottesville, Virginia) benutzt. Protein A ist ein Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus* und Protein G stammt aus Streptococcen. Beide binden mit hoher Affinität den F_c-Teil von Antikörpern, weshalb zur Präzipitation proteinspezifische Antikörper (nicht-kovalent) an die Agarose gekoppelt werden können. Bei der Inkubation dieser mit einem Proteingemisch bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe und es ist möglich das Protein durch Zentrifugation der Agarose zu präzipitieren. Für die Immunpräzipitation werden solubilierte Mikrosomen oder Gesamtzellextrakte (3.3.5) eingesetzt. Das Gewebesolubilisat wird zuerst über Protein A bzw. G-Agarose durch Inkubation vorgereinigt, um unspezifisch an die Agarose bindende Proteine und IgGs aus dem Gewebeextrakt zu entfernen, die später zusätzlich an Protein A/G binden könnten (Preclearing). Parallel werden 30 µl Agarosematerial pro Immunpräzipitation zur Äquilibrierung und Entfernung des Lagermediums dreimal mit PBS gewaschen und daran jeweils 5-15 µg affinitätsgereinigte Antikörper in 1x PBS gekoppelt (mindestens 1 Stunde bei 4 °C). Zum Entfernen der nicht an das Agarosematerial gebundenen proteinspezifischen Antikörper, wird dieses 2-mal mit dem Puffer, der auch zur Extraktion der Proteine genutzt wurde, gewaschen. Der vorgereinigte Proteinextrakt und die Antikörper-gekoppelte Agarose werden zusammen für 2-3 Stunden oder über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Im Anschluss daran wird das

Immunpräzipitat mit IP-Waschpuffer (nur bei Triton X-100) oder dem gleichen Puffer (+ Detergenz), der zur Solubilisierung benutzt wurde (Tabelle 9), allerdings ohne Protein, 5-6 Mal mit 500 µl gewaschen. Die Elution der Immunkomplexe erfolgt durch Zugabe von 70 µl 2x SDS-Probenpuffer und anschließender Denaturierung bei 61 °C für 20 Minuten. Die Proteine werden dann im Westen Blot (3.3.11) analysiert.

3.3.7 Herstellung und Anwendung von Antikörper-Affinitätsäulen

Affinitätsäulen können dazu benutzt werden, um aus einem komplexen Proteingemisch einzelne Proteine mit ihren dazugehörigen Interaktionspartnern anzureichern. Dabei wird die Affinität des gewünschten Proteins zu einem bestimmten Liganden ausgenutzt. Bei der Antikörper-Affinitätschromatographie werden dabei proteinspezifische Antikörper kovalent an ein Trägermaterial als stationäre Phase gekoppelt. Der Vorteil dieser kovalenten Kopplung besteht darin, dass das Säulenmaterial mehrmals verwendet werden kann. Nach einer abgeschlossenen Affinitätsreinigung wird dieses durch eine Behandlung mit Glycin pH 2,2 wieder regeneriert. Durch diesen geringen pH-Wert werden alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen zerstört und alle gebundenen Proteine abgelöst. Die kovalent gebundenen Antikörper werden allerdings nicht entfernt, wodurch das gekoppelte Säulenmaterial mehrmals verwendet werden kann. Zur kovalenten Kopplung von Antikörper an Chromatographiesäulen gibt es verschiedene Methoden, von denen im Folgenden die Kopplung der Antikörper an Protein A/G-Agarose bzw. an AminoLink-Agarose beschrieben wird.

3.3.7.1 Kovalente Kopplung an AminoLink-Agarose

Die Kopplung von Antikörpern an AminoLink Agarose (Thermo Scientific, Bonn) erfolgt über primäre Amine (-NH₂) der Antikörper an eine aktivierte Aldehydgruppe, die mit der Agarose verbunden ist. Während der Inkubation von Antikörpern mit der AminoLink-Agarose reagieren in einer reduktiven Aminierungsreaktion die Aminogruppen der Lysinreste der Antikörper mit den Aldehydgruppen an der Agarose unter Ausbildung einer Schiff'schen Base. Diese Bindungen werden in einem zweiten Schritt in Gegenwart von Natriumcyanoborohydrid in stabile sekundäre Amine umgewandelt. Zur Kopplung werden pro Ansatz 100 µl Agarose eingesetzt, die mit PBS (pH 7,2) gewaschen wird. Anschließend wird der Antikörper (20 µg), verdünnt in 150 µl PBS, und 2 µl Cyanoborohydrid (Endkonzentration ~ 65 mM) zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C unter Schütteln wird die Antikörper-Lösung abgenommen und einmal mit PBS (pH 7,2) und dann

mit Tris/HCl (pH 7,4) gewaschen. Um die restlichen freien Bindestellen zu blockieren, wird das Agarosematerial mit 1 M Tris/HCl und 2 µl Cyanoborohydrid für 30 Minuten inkubiert und anschließend noch mit 1 M NaCl gewaschen. Zur Aufbewahrung wird die fertige Säule in TBS gelagert. Zum Testen, ob die kovalente Kopplung der Antikörper funktioniert hat, wird die Säule mehrmals mit 0,1 M Glycin pH 2,2 inkubiert und diese Eluate im Western Blot (3.3.11) auf das Vorhandensein von Antikörpern überprüft.

3.3.7.2 Kovalente Kopplung an Protein A/G Agarose

Die kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A/G Agarose erfolgt anfangs nach dem gleichen Prinzip wie bei der Immunpräzipitation (3.3.6). Über den F_c-Teil wird der Antikörper gebunden und anschließend mit Hilfe des Quervernetzters DSS (Disuccinimidyl Suberat) kovalent mit dem Säulenmaterial verbunden. Zu Testzwecken werden nur 50 µl Protein A Agarose mit 20 µg Antikörper gekoppelt und für einen präparativen Ansatz werden an 1,5 ml Protein A/G Gemisch (Verhältnis Protein A zu G: 2:1) 3,5 mg Antikörper gekoppelt. Die Antikörperlösung wird nach Waschen des Säulenmaterials mit PBS (pH 8,0) mit diesem für 1 Stunde bei Raumtemperatur und eine weitere Stunde bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden nicht gebundene Antikörper mit PBS ausgewaschen. Das Quervernetzen erfolgt durch Zugabe von 1 mM DSS und einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Das DSS besitzt, als homobifunktionaler Quervernetzer, an jedem Ende einer Kette von acht C-Atomen eine Amin-reaktive N-hydroxysuccinimidyl(NHS)-Gruppe, und kann dadurch mit zwei Proteinen gleichzeitig reagieren. Diese NHS-Ester reagieren wie bei der AminoLink-Kopplung beschrieben mit primären Aminen bei pH 7-9 unter Bildung einer kovalenten Bindung (Pierce Biotechnology, Rockford). Nach dem Quervernetzungsschritt wird die DSS-Lösung abgenommen und die noch verbleibenden freien Bindestellen an DSS-Molekülen durch Zugabe von 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) für 15 Minuten blockiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit TBS wird auch hier, wie bei der AminoLink-Kopplung beschrieben (3.3.7.1), die Bindung durch eine Glycin-Inkubation getestet, bevor die Säule verwendet werden kann.

3.3.7.3 Antikörper-Affinitätschromatographie

Für eine Antikörper-Affinitätschromatographie werden 150-200 mg Plazentamikrosomen (3.3.1.1) mit Triton X-100 als Detergenz solubilisiert (3.3.5) und anschließend über Nacht bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 ml/Minute über eine Protein A/G-Antikörper-Affinitätssäule gepumpt. Nach Waschen der Säule mit TBS werden die gebundenen Proteine

durch eine Inkubation mit Glycin (pH 2,5) + 0,1% Triton X-100 eluiert. Die Elution erfolgt so lange, bis eine Absorptionsmessung bei 280 nm einen Wert von annähernd null erreicht. Das Eluat wird anschließend in Ultrafiltrationsröhrchen aufkonzentriert (Ausschlussgröße 10 kDa), um das Glycin zu entfernen und das Volumen zu verringern. Allerdings bleibt das Triton X-100, das eine Mizellengröße von 90 kDa besitzt, in der Lösung vorhanden und würde später die SDS-PAGE stören. Deshalb wird das erhaltene Eluat noch mit TCA gefällt (3.3.4) und danach in einer SDS-PAGE (3.3.9.3) mit anschließendem Western Blot (3.3.11) analysiert.

3.3.8 Deglykosylierung von TRPV5 aus transfizierten COS-Zellen

Ist ein Protein glykosyliert, so trägt es eine oder mehrere Kohlenhydratgruppen, die posttranslational angefügt wurden. Eine enzymatische Abspaltung dieser Kohlenhydratgruppen mit verschiedenen Enzymen wird als Deglykosylierung von Proteinen bezeichnet. Hierzu werden COS (CV-1 in Origin, carrying the SV40 genetic material)-Zellen mit der murinen cDNA von TRPV5, im Vektor pCAGGS, transfiziert und die Zellen 48 Stunden nach Transkription geerntet. Das Zellpellet, eingefroren bei -80 °C, wurde von der Abteilung von Prof. Flockerzi (Pharmakologie der Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden anschließend durch Homogenisieren mit einem Minimörser in einem Reaktionsgefäß und durch Scheren mit einer Kanüle im 1x Solubilisierungspuffer mit 2% Triton X-100 (+ Proteaseinhibitorenmix) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde 1 Stunde bei 4 °C gerührt und anschließend in einem Ultrazentrifugationsschritt (100.000xg, 45 Minuten) die Zelltrümmer entfernt. Das erhaltene Zelllysate wurde anschließend für eine Immunpräzipitation (3.3.6) eingesetzt und statt der Elution mit 2x SDS-Ladepuffer von der Agarose eine Deglykosylierung angeschlossen. Als Enzym wurde die PNGase F (Peptide: N-Glycosidase F) benutzt (NEB, Frankfurt/Main), welche als Endoglykosidase zwischen dem innersten N-Acetylglukosamin- und dem Asparaginrest N-glykosylierter Proteine, sowohl vom mannosereichen, dem komplexen, als auch dem Hybrid-Typ schneidet [Maley et al., 1989]. Zur Deglykosylierung werden die an die Agarose gebundenen Proteine erst im mitgelieferten Glykoprotein-Denaturierungspuffer für 10 Minuten bei 61 °C denaturiert. Nach Zugabe von G7 Reaktionspuffer, 1% NP-40 und 3µl (500 U/µl) PNGase F wurde der Ansatz für 1,5-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2x SDS-Ladepuffer zum Ablösen der an die Agarose gebundenen (deglykosylierten) Proteine und Denaturierung bei 61 °C für 20 Minuten. Die Deglykosylierung der Proteine wird anschließend im Western Blot (3.3.11) analysiert.

3.3.9 Proteingele

3.3.9.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

In einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (3.3.9.3) wird als Trägermatrix ein Polyacrylamidgel, das SDS enthält, verwendet. Im diskontinuierlichen System nach Lämmli [Laemmli, 1970] mit Tris-Glycin-Puffern überschichtet ein Sammelgel (pH 6,8) ein Trenngel (pH 8,8). Die Länge der Polyacrylamidketten wird durch die Acrylamidkonzentration bestimmt und der Vernetzungsgrad der Ketten durch die Bisacrylamidkonzentration. Dazu werden erst für das Trenngel die entsprechenden Mengen 40% Acrylamid/Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe), Trenngelpuffer und Wasser zusammenpipettiert (Tabelle 10). Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Zugabe von APS (10% (w/v) in Wasser), welches leicht Radikale bildet, ausgelöst. Als Katalysator dient dabei TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin). Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine werden Trenngele mit unterschiedlicher Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration benutzt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele für SDS-Polyacrylamidgele

Komponente	Acrylamid-Konzentration				
	7%	8%	10%	12%	15%
4x Trenngelpuffer, pH 8.8 [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
40% Acrylamid-Stock (29:1) [ml]	1,75	2,0	2,50	3,0	3,75
Wasser [ml]	5,66	5,41	4,91	4,41	3,66
10% APS [μ l]	75	75	75	75	75
TEMED [μ l]	15	15	15	15	15
Gesamtvolumen	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml

Nachdem das noch flüssige Trenngel zwischen 2 Glasplatten (Abstand kleine Gele: 0,75 mm, große Gele 1,5 mm) eingefüllt wurde, werden die Gele mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird das Isopropanol wieder abgegossen und ein 4%-iges Sammelgel (Tabelle 11) auf das Trenngel gegossen.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines 4%igen Sammelgels.

Komponente	Acrylamid-Konzentration
	4%
4x Sammelgelpuffer, pH 6.8 [ml]	1,25
40% Acrylamid-Stock (29:1) [ml]	0,50
Wasser [ml]	3,21
10% APS [μ l]	37,5
TEMED [μ l]	7,5
Gesamtvolumen	5 ml

Zum Starten der Vernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid werden auch hier wieder APS und TEMED zugegeben. In das noch flüssige Sammelgel werden zur Formung von Taschen, in die später die Proben eingefüllt werden, Kämme eingesetzt (10 oder 15 Taschen) und gewartet, bis die Gele auspolymerisiert sind. Danach kann der Gießstand abgebaut und die fertigen Gele in feucht eingewickeltem Papier bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.3.9.2 Herstellung von linearen Gradientengelen

Proben, die viele Proteine mit verschiedenen Molekulargewichten enthalten, werden in linearen Gradientengelen aufgetrennt. In dieser Arbeit wird immer ein linearer Gradient von 7% bis 15% für das Trenngel gewählt. Das Sammelgel ist wie bei den anderen Gelen auch 4%-ig. Die Zusammensetzungen entsprechen den in **Tabelle 10** und **Tabelle 11** angegebenen Mengen, wobei nur große Gradientengele (30 ml) gegossen werden und die angegebenen Werte bis auf APS und TEMED (jeweils einfache Menge) verdreifacht werden. Für das Trenngel wird eine 15%-ige und eine 7%-ige Gellösung angesetzt, in den Gradientenmischer (cti, Münster) gegeben und dann erst APS und TEMED zugegeben. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (GE Healthcare, München), die an den Gradientenmischer angeschlossen ist, werden die Gellösungen zwischen 2 Glasplatten mit Spacer gegossen und dabei ein linearer Konzentrationsgradient im Trenngel erzeugt. Dieses wird mit Isopropanol überschichtet und nach Auspolymerisation das Sammelgel wie in 3.3.9.1 beschrieben gegossen.

3.3.9.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. In einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird als Trägermatrix ein Polyacrylamidgel (3.3.9), das SDS enthält verwendet. Bevor die Proteine aber aufgetrennt werden können, werden sie im gleichem Volumen 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und standardmäßig für 20 Minuten bei 61 °C denaturiert (alternativ: 30 min 37 °C; 5 min 95 °C). Dabei werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken aufgelöst und durch das β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen zerstört. Das in diesem Puffer vorhandene SDS bindet an die denaturierten Proteine und bildet mit ihnen einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex mit konstantem Masse zu Ladungsverhältnis aus, in dem die Eigenladung der Proteine durch das SDS überdeckt wird. Durch Denaturierung und das SDS nehmen die Proteine eine langgestreckte Form an und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Der Molekularsiebeffekt trennt die Proteine während der Wanderung im Gel nach ihrem Molekulargewicht auf. Zur Gelelektrophorese wird die Gelapparatur (kleine Gele: BioRad, München; große Gele: GE Healthcare, München) mit den eingebauten Gelen mit 1x SDS Elektrophoresepuffer gefüllt und die denaturierten Proben in die Taschen des Gels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgt nach folgendem Programm:

Kleine Gele: 80 V 0,5 h
150 V bis Ende

große Gele: 100 V 0,5 h
400 V bis Ende

Das Gel wird anschließend entweder für eine Färbung (3.3.10) oder einen Western Blot (3.3.11.1) eingesetzt.

3.3.10 Färbung von Proteingelen

3.3.10.1 Coomassie-Blau-Färbung

Die Anfärbung der in einer SDS-PAGE (3.3.9.3) aufgetrennten Proteine im Gel erfolgt durch eine Coomassie-Blau-Färbelösung für 20 bis 45 Minuten. Der im sauren anionisch vorliegende Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R250 lagert sich dabei an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an, so dass spezifisch Proteine gefärbt werden. Anschließend wird das Gel so lange in Entfärber geschwenkt, bis deutliche Banden zu erkennen sind. Nach einer kurzen Inkubation in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ wird das Gel zur Aufbewahrung zwischen zwei

Zellophanfolien für 1,5 Stunden bei 70 °C auf dem Gelrockner (BioRad, München) getrocknet.

3.3.10.2 "Blue-Silver"-Färbung

Die Methode der "Blue-Silver"-Färbung wurde 2004 von Candiano [Candiano et al., 2004] eingeführt. Sie beruht auf der schon früher beschriebenen kolloidalen Coomassie-Färbung [Neuhoff et al., 1988], wobei die Nachweisgrenze bei ca. 1 ng liegt. Wie der Name schon andeutet, vereint sie damit die Eigenschaften einer Coomassie-(Blau)-Färbung mit der Nachweisgrenze, die der Silberfärbung nahe kommt. Das Gel wird dazu für mindestens eine Stunde mit der Fixierungslösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren und anschließend dreimal für 15 Min. in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gewaschen. Die eigentliche Färbung erfolgt über Nacht oder länger in der "Blue-Silver"-Färbelösung. Durch Inkubation in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ kann die Hintergrund-Färbung reduziert werden.

3.3.11 Western-Blot-Analyse

3.3.11.1 Western Blot

Im Western-Blot [Towbin et al., 1979] werden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran; Perkin Elmer, Boston) übertragen und dort mittels Antikörper immunologisch nachgewiesen. Zur Übertragung der Proteine im Tankblotting-Verfahren wird der Blot folgendermaßen zusammengebaut und in ein Kunststoffgitter eingelegt (Schwammtuch und Whatmanpapier werden vorher in Transferpuffer äquilibriert):

Schwammtuch
2 Lagen Whatman-Papier
Nitrocellulose-Membran
SDS-Polyacrylamidgel
2 Lagen Whatman-Papier
Schwammtuch

Das Sandwich wird so in die Halterung der Blotkammer (BioRad, München) eingesetzt, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode hin orientiert sind. Die eisgekühlte Kammer wird anschließend mit kaltem Transferpuffer gefüllt und der Transfer durch Anlegen der folgenden Stromstärken gestartet:

Kleines Gel: 350 mA 1 Stunde

Großes Gel: 400 mA 4,5 Stunden
oder: 120 mA über Nacht

Durch Inkubation der Membran mit einer Ponceau-S-Lösung (10 Minuten) und anschließender Entfärbung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ werden die Proteine auf der Membran angefärbt und so der Erfolg des Transfers kontrolliert. Die Proteine können jetzt mittels Immunfärbung (3.3.11.2) detektiert werden.

3.3.11.2 Immunfärbung im Western Blot

Der Nachweis der Proteine erfolgt mit Hilfe proteinspezifischer Antikörper (immunologisch), die aus mono- oder polyklonalen Seren aufgereinigt wurden, oder z.T. wird das ungereinigte Serum direkt eingesetzt. Nach dem Transfer der Proteine wird die Membran für eine Stunde in Blockpuffer geschwenkt, um noch nicht besetzte Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend erfolgt bei 4 °C über Nacht die Inkubation mit dem primären Antikörper, der gegen das interessierende Protein gerichtet ist. Die Verdünnung ist variabel und abhängig vom eingesetzten Antikörper (Tabelle 5). Daraufhin wird die Membran dreimal 10 Minuten in TBS gewaschen, um nicht gebundene primäre Antikörper zu entfernen, bevor die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper erfolgt. Der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper, der gegen den F_c -Teil des Primärantikörpers gerichtet ist, wird in unterschiedlichen Verdünnungen (Tabelle 6) in Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgt die Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz ("Western Lightning Chemiluminescence Reagent"; Perkin Elmer, Boston) nach den Herstellerangaben. Zur Detektion der Signale werden die Membranen einem lichtempfindlichen Röntgenfilm (Fuji, Tokyo) exponiert, der sich an den belichteten Stellen (Signale) schwarz färbt.

3.3.11.3 Entfernen von Antikörpern von der Nitrocellulose-Membran

Zur Entfernung von Antikörpern von einer Blotmembran wird diese viermal für 5 Minuten in TBST gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 50 °C in "Stripping"-Puffer im Wasserbad inkubiert. Nach weiteren sechs Waschschritten mit TBST wird die Membran für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert und anschließend für eine weitere Immunfärbung (3.3.11.2) eingesetzt.

3.4 TRPV5 Antikörper-Generierung und –Charakterisierung

3.4.1 Auswahl der Peptidsequenzen zur Antikörper-Generierung

Zur Generierung polyklonaler Antikörperseren werden Kaninchen mit Peptiden, die vom TRPV5 Protein abgeleitet sind, immunisiert. Ist das eigentliche Antigen, wie bei TRPV5, ein Membranprotein, so kommen als putativ antigene Regionen eigentlich nur der N- bzw. der C-Terminus und die Schleifenregionen der TM-Domänen in Frage, da diese nicht in die Membran eingebaut sind. Als besonders antigen hat sich erfahrungsgemäß der absolute C-Terminus herausgestellt, weshalb eine Sequenz von 12 Aminosäuren in diesem Bereich ausgewählt wurde (Peptid 982: G₇₁₅SEGDGEEVYHF). Eine weitere Sequenz wurde ausgewählt, weil bereits von einer anderen Arbeitsgruppe [Janssen et al., 2002] die Generierung von Antikörpern mit einer ähnlichen Sequenz als Antigen beschrieben wurde (Peptid 1052: T₆₉₁ASQSSSHRGWEILRQ). Als Alternative wurden in einem Hopp-Woods-Diagramm potentiell antigene Bereiche der Proteinsequenz bestimmt [Hopp et al., 1981; Hopp et al., 1983]. Das Diagramm zeigt grundsätzlich die Hydrophilie eines Proteins an, in dem apolaren Aminosäure-Resten negative Werte zugeordnet werden. Die zugeordneten Werte reichen von -3,4 (Tryptophan) bis 3,0 (u.a. Arginin, Lysin). Es wird dabei angenommen, dass hydrophile Bereiche auf der Oberfläche von Proteinen liegen und somit als antigene Determinante geeignet sind. Antigene Bereiche werden am besten bei einer "Fenstergröße" (window size) von 6-7 bestimmt. Die Fenstergröße bezieht sich darauf, wie viele Aminosäuren jeweils zusammen untersucht werden, um den Grad der Hydrophilizität festzustellen.

Mit Hilfe dieser Vorhersage wurden 2 weitere Peptid-Sequenzen ausgewählt, die für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt wurden, die Peptide 1074 (E₂₈₈ELSFLELVVSSDKR) und 1075 (E₆₄₉VFKNSDKEDDQEHP). Die Herstellung der synthetischen Peptide, die Kopplung an KLH (keyhole limpet haemocyanin) und die Immunisierung der Kaninchen sowie die Gewinnung der Seren erfolgte in der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Zimmermann/PD Dr. M. Jung.

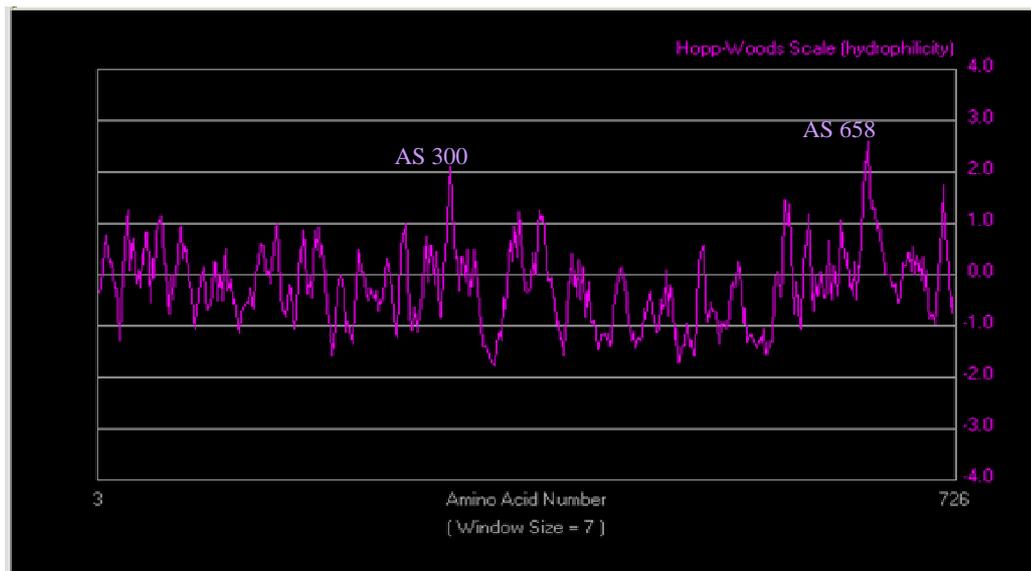


Abb. 8: Hopp-Woods-Diagramm der humanen TRPV5 (GenBank Accession Nr. AJ271207) Sequenz mit einer Fenstergröße von 7. Die X-Achse zeigt die Aminosäuresequenz, auf der Y-Achse sind die Hydrophilizitätswerte aufgetragen. Die Nummern der Aminosäuren mit den größten Werten wurden angegeben.
(<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>)

3.4.2 ELISA zum Austesten der Antikörperseren

Der ELISA (**E**nzyme-**L**inked-**I**mmunosorbent **A**ssay), ist ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, der z.B. zum schnellen Nachweis von proteinspezifischen Antikörpern in Kaninchenseren verwendet wird. Ausgenutzt wird dabei die spezifische Antigen-Antikörper-Erkennungsreaktion, die mit einer enzymgesteuerten Farbreaktion gekoppelt wird. Das Antigen (das zur Immunisierung eingesetzte Peptid) wird in einer Konzentration von 10 µg/ml in Carbonatpuffer angesetzt und jeweils 100 µl davon pro Kavität durch Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C an eine polystyrol-beschichteten Mikrotiterplatte (MaxisorpTM, Nunc, Wiesbaden) gekoppelt. Nicht gebundenes Peptid wird in 3 Waschschrritten mit ELISA-Waschpuffer (jeweils 300 µl pro Kavität) ausgewaschen und anschließend die Platte trocken geklopft. Bindestellen, die nicht durch das Peptid abgedeckt wurden, werden in einem anschließenden Blockschrift mit ELISA-Blockpuffer über Nacht bei 4 °C blockiert. Nach Entfernen des Blockpuffers werden jeweils 100 µl der verdünnten Seren (je nach Serum 1:100 bis 1:50.000 in PBS, pH 7,1) in die beschichteten Platten zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Daran schließt sich ein erneuter Waschschrift an. Die aus dem Serum gebundenen Antikörper werden im folgenden Schritt über einen peroxidasekonjugierten Sekundäantikörper nachgewiesen. Dieser wird dazu 1:50.000 in PBS (pH 7,1) verdünnt und ebenfalls 100 µl pro Kavität zugegeben. Die Bindung erfolgt analog der Immunfärbung im Westen-Blot (3.3.11.2) über den F_c-Teil des ersten Antikörpers. Auch hier schließt sich ein

Waschschritt an, um nicht gebundene IgGs zu entfernen. Zur Kontrolle, ob in dem zu testenden Serum Antikörper vorhanden sind, die an das Peptid gebunden haben, wird eine Farbreaktion ausgelöst, wobei die Meerrettich-Peroxidase des Sekundärantikörpers, nach Zugabe von jeweils 50 µl Wasserstoffperoxid (0,02% in Acetatpuffer) und TMB (Tetramethylbenzidin; 2,5 mg/ml in Acetatpuffer), die Bildung eines blauen Farbstoffkomplexes hervorruft. Diese Reaktion dauert bei Raumtemperatur etwa 20 Minuten, wonach die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,5 N Schwefelsäure abgestoppt werden kann und dadurch ein Farbumschlag von blau nach gelb zu beobachten ist. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers. Deshalb wird die Extinktion der einzelnen Kavitäten bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Thermo Labsystems, Egelsbach) bestimmt. Als Referenzwert wird zu dem Serum, das getestet wird, das entsprechende Präimmunserum in den gleichen Verdünnungen eingesetzt, da hier die spezifischen Antikörper nicht vorhanden sein sollten.

3.4.3 TRPV5-Peptidblots

Peptidblots sind Filtermembranen, auf die die komplette Sequenz eines Proteins in einzelnen Peptiden aufgespottet ist. Die Peptide besitzen eine Länge von jeweils 10 Aminosäuren, wobei es von einem Spot zum nächsten eine Überlappung von 5 Aminosäuren gibt. Mit diesen Membranen ist es möglich einen Anhaltspunkt zu bekommen, wo die Epitope eines Antikörpers in der Proteinsequenz liegen.

3.4.3.1 Antikörper-Inkubation auf Peptidblots

Zuerst wird die Membran mit 100% Methanol benetzt (5 Minuten), dann erfolgt ein Waschschritt mit TBS und daraufhin eine einstündige Inkubation in 5% (w/v) BSA (in TBS), um eventuell noch vorhandene Bindungsstellen für Proteine zu blockieren. Die weitere Detektion mit den Antikörpern erfolgt genau nach dem Protokoll, wie bei der Immunfärbung im Western Blot beschrieben (3.3.11.2).

3.4.3.2 Regeneration von Peptidblots

Um Peptidblots, die schon einmal für eine Antikörper-Inkubation eingesetzt wurden ein weiteres Mal zu verwenden, werden gebundene Antikörper entfernt. Dazu wird die Membran in folgender Reihenfolge 3-mal für 10 Minuten in Regenerationspuffer A, Regenerationspuffer B und reinem Ethanol inkubiert. Anschließend wird der Blot getrocknet und eingeschweißt bei -20 °C gelagert, oder direkt für einen neuen Versuch eingesetzt.

3.4.4 Herstellung einer Peptid-Affinitätssäule mit NHS-Sepharose

Um die Antikörperseren der Kaninchen aufzureinigen, wird das immunogene Peptid an eine *N*-hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Sepharose kovalent gekoppelt. Dazu wird das verwendete Säulenmaterial (2 ml; GE Helathcare, München) in einer Chromatographie-Säule (Sigma, München) erst mit der 10-15-fachen Menge kalter 1 mM HCl aktiviert werden. Zu dem aktivierten Säulenmaterial wird die Peptidlösung (1 mg/ml in Peptidbindungspuffer) gegeben und beides zusammen in der verschlossenen Säule für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend lässt man die Peptidlösung heraustropfen und die freien NHS-Gruppen werden über Nacht mit 0,5 M Ethanolamin + 0,5 M NaCl (pH 8,0) bei 4 °C blockiert. Zum Fertigstellen der Säule lässt man den Blockierungspuffer aus der Säule heraustropfen und wäscht dreimal alternierend mit 0,1 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl (pH 4) und 0,5 M Ethanolamin + 0,5 M NaCl (pH 8), um nicht (kovalent) gebundene Peptide von der Säule zu entfernen. Gelagert wird die Säule bei 4 °C in TBS Puffer (+0,05% Natriumazid).

3.4.5 Isolierung von Antikörpern aus Kaninchenserum über eine Peptidsäule

Nach einer Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid wird den Tieren Blut abgenommen und daraus das enthaltene Serum gewonnen. In diesem Serum sind alle Antikörper enthalten, die das Tier zu diesem Zeitpunkt gebildet hat, also auch welche die nicht spezifisch gegen das interessierende Protein gerichtet sind. Um aus dem Serum spezifische Antikörper zu gewinnen, die nur das antigene Protein erkennen, werden die Seren über eine Peptidsäule (3.4.4) aufgereinigt. Die gewünschten Antikörper binden dabei an das entsprechende Peptid und alle anderen Antikörper aus dem Serum passieren die Säule ohne zu binden. Nach Elution der Antikörper von dem Peptid erhält man affinitätsgereinigte Antikörper, die für viele weitere Anwendungen (z.B. Western Blots, Antikörper-Affinitätssäulen oder Immunhistochemie) eingesetzt werden können. Zur Aufreinigung über eine Peptid-Affinitätssäule (3.4.4) werden 5 ml Serum eines immunisierten Tieres eingesetzt und diese mit 15-20 ml TBS verdünnt. Diese Serumlösung wird über Nacht bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min im Kreis über die Säule gepumpt. Um nicht gebundene Antikörper und andere Serumbestandteile zu entfernen, wird die Säule im Anschluss so lange mit TBS gewaschen, bis eine Absorptionsmessung bei 280 nm einen Wert von nahezu null erreicht. Zur Elution wird die Säule mehrmals mit 0,1 M Glycin, pH 2,2 für 2-3 Minuten inkubiert und die Absorption verfolgt. Durch den pH-Sprung ins stark Saure wird die Konformation der Antikörper geändert und die ionischen Wechselwirkungen zwischen

Antikörper und Peptid gelöst. Das Eluat wird direkt in 1 M Tris/HCl mit einem pH Wert von 8,0 umgepuffert, damit die Antikörper nicht denaturieren. Die erhaltenen Eluate werden durch Ultrafiltration in Vivaspin-Konzentrationsröhrchen (molekulare Ausschlussgröße 50 kDa) aufkonzentriert und gleichzeitig durch dreimaliges Waschen in TBS umgepuffert. Die Antikörperkonzentration wird photometrisch bei 280 nm bestimmt und anschließend mit TBS + 1% (w/v) BSA oder PBS, je nach Art der Weiterverwendung, auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

3.5 Indirekte Immunhistochemie mit humanen Plazentaschnitten

Bei der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern aus, um die Verteilung eines Antigens im Gewebeschnitt (subzelluläre Lokalisation) zu untersuchen. Die im Folgenden beschriebene Methode wurde von Bernucci [Bernucci et al., 2006] übernommen und in wenigen Punkten modifiziert.

3.5.1 Gewebevorbereitung

Das frische Plazentagewebe wird nach einem Kaiserschnitt im lokalen Krankenhaus auf Eis abgeholt und aus dem Gewebe Blöcke mit einer Größe von ungefähr 1 cm³ herausgeschnitten. Das Blut wird mehrmals mit eiskalter 0,9% (w/v) NaCl-Lösung ausgewaschen. Anschließend werden die Gewebelöcke in Kryogel (LEICA Microsystems GmbH, Nussloch) möglichst schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.2 Anfertigung und Fixierung von Kryoschnitten

Von den in 3.5.1 vorbereiteten Gewebelöcken werden in einem Kryostat (CM 3000, LEICA, Nussloch) mit einer Kammertemperatur von -20°C Schnitte mit einer Dicke von 10-15 µm angefertigt und auf Objektträger (superfrost Ultra Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Diese Schnitte lässt man für mehrere Stunden an der Luft trocknen bevor sie anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd in TBS fixiert werden. Nach drei Waschschrinen mit TBS Puffer (je 10 Minuten), werden die Schnitte über Nacht bei 4 °C in TCT-Puffer geblockt. Dieser Puffer enthält Triton X-100, welches die Zellmembranen permeabilisiert, damit die Antikörper später in die Zellen eindringen können. Als blockende Substanz ist das λ-Carrageen, ein Polysaccharid enthalten, welches üblicherweise als Blocker in der Immunhistochemie eingesetzt wird [Renaud-Young et al., 2002; Trius et al., 1996]. Nach der Inkubation wird überschüssiger TCT-Puffer mit einem

weichen fusselfreien Tuch entfernt und die geblockten Gewebeschnitte im Anschluss für eine Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt.

3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung und Detektion

Alle Schritte zur Immunfluoreszenz-Färbung werden in einer dunklen Feuchtkammer durchgeführt. Die geblockten Gewebeschnitte werden für zwei Stunden mit dem Primärantikörper (ca. 30-50 µl) in der gewünschten Verdünnung (in H₂O_{ddest}) bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Färbung der Zellkerne wird durch Propidiumjodid erreicht, welches ein Fluorochrom ist, das in Nukleinsäuren (DNA+RNA) interkaliert. Dazu wird in die Verdünnung des Erstantikörpers zusätzlich Propidiumjodid in einer Konzentration von 5 µg/ml gegeben und gleichzeitig vorhandene RNA durch eine RNase (10 µg/ml) verdaut, da ansonsten das Propidiumjodid auch mit der RNA innerhalb der interagiert. In drei aufeinander folgenden Waschschritten mit TBS (je 10 Minuten) werden nicht gebundene Primärantikörper bzw. nicht gebundenes Propidiumjodid entfernt und die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (Invitrogen, Karlsruhe) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser zweite Antikörper, der gegen den F_c-Teil des ersten gerichtet ist, ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und erzeugt nach Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge ein Fluoreszenzsignal, welches detektiert wird. Nach der Zweitantikörperinkubation wird wie vorher beschrieben 3-mal mit TBS gewaschen und anschließend können die Schnitte mit Eindeckmedium (Citifluor, Citifluor Ltd, London) und Deckgläsern eingebettet werden. Die Schnitte wurden entweder in einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena) oder einem normalen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) betrachtet und dokumentiert. Die Bilder wurden dann mit der LSM Image Browser Software oder Corel PHOTO-PAINT 11 bearbeitet und bei Doppelfärbungen mit der Software die beiden Bilder überlagert.

3.6 **Pulldown mit GST-Fusionsproteinen**

Der GST-"Pulldown" ist eine weit verbreitete Methode, um Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren und charakterisieren. Bei dieser *in vitro* Technik wird ein in Bakterien exprimiertes und an eine Matrix gekoppeltes Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein als Fänger-Protein eingesetzt, um aus einem Zell- oder Gewebeextrakt mögliche Interaktionspartner zu binden. Nicht gebundene Proteine aus dem Extrakt können durch waschen entfernt werden und die gebundenen Proteine nach Elution in einer SDS-PAGE analysiert werden. In den meisten Fällen sind die zu identifizierenden Proteine radioaktiv

markiert [Guan et al., 1991], es können aber auch, wie in dieser Arbeit, unmarkierte Proteine eingesetzt werden, die später über eine chromogene Färbung visualisiert werden. Zur Durchführung wird humanes Plazentagewebe eingesetzt, wobei entweder ein Homogenat aus dem villösen Gewebe der Plazenta hergestellt wird, oder solubilisierter Plazentamikrosomen eingesetzt werden. Für das Homogenat werden 5 g Plazentagewebe in 20 ml Extraktionspuffer mit einem Ultraturrax zerkleinert und anschließend im Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Nachdem das Homogenat für 1 Stunde bei 4 °C gerührt wurde, wird es für 45 Minuten bei 100.000xg ultrazentrifugiert. 1-2 ml des erhaltenen Extrakts werden zusammen mit gekoppeltem Fusionsprotein über Nacht bei 4 °C inkubiert. Werden für den Pull-down Plazentamikrosomen eingesetzt, so werden pro Ansatz 160 mg Mikrosomen mit Triton X-100 wie unter 3.3.5 beschrieben sowie den in Tabelle 9 angegebenen Mengen solubilisiert. Von dem erhaltenen Solubilisat werden 48-50 µl für den Pull-down-Versuch eingesetzt. Von den GST-Fusionsproteinen bzw. GST selbst als Negativkontrolle werden pro Ansatz 20 µg in TBS an 50 µl äquilibrierte Glutathion (GSH)-Agarose (Protino, Macherey-Nagel, Düren) durch Inkubation für mindestens 2 Stunden bei 4 °C gebunden. Alternativ kann nach einer Isolation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien (3.2.2) der Elutionsschritt weggelassen und 50 µl der GSH-Agarose mit den gebundenen Proteinen direkt zur Inkubation mit dem Gewebeextrakt/Solubilisat eingesetzt werden. Um nach der Inkubation des Extraktes mit den Fusionsproteinen nicht gebundene Proteine zu entfernen, wird sechsmal mit 1 ml IP-Waschpuffer gewaschen und im Anschluss werden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 70 µl 2x-SDS-Probenpuffer eluiert. Nach Denaturierung der Proben bei 61 °C für 20 Minuten werden die Proteine in einem linearen Gradientengel aufgetrennt und anschließend mit einer "Blue-Silver"-Färbung sichtbar gemacht.

3.7 Massenspektrometische Analyse von Proteinen

Die Massenspektrometrie, als eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum, ist eine der sensitivsten und schnellsten Methoden zur Proteinidentifikation. Zur Analyse meiner Proben wurde ein Elektrospray-Quadrupol-Time of Flight-Massenspektrometer (ESI-Q-ToF) der Firma Waters Micromass (Eschborn; Micromass Q-TOF 2TM) verwendet. Die Messungen der Proben wurden von Dipl.-Biochem. Thomas Schulenburg, AG Friauf, Fachbereich Biologie der TU Kaiserslautern durchgeführt. Da bei dieser Art von Massenspektrometer zwei Masseanalytoren hintereinander geschaltet sind, spricht man auch von Tandem-Massenspektrometrie. Bei dieser Messung entsteht also neben

einem Übersichtsspektrum (MS-Spektrum) aller Peptide, die von einer Probe detektiert wurden, auch das dazugehörige Fragmentspektrum einzelner Peptide (MS/MS-Spektrum). Das MS/MS-Spektrum liefert nach Auswertung mit entsprechender Software die wahrscheinliche Sequenzabfolge der einzelnen Peptide, welche im Anschluss durch Vergleich mit Datenbanken einem bestimmten Protein zugeordnet werden können [Aebersold et al., 2003].

3.7.1 Vorbereitung von Proteinbanden für die Massenspektrometrie

Die Proteine werden in einer SDS-PAGE (3.3.9.3) aufgetrennt und anschließend mit der "Blue-Silver"-Färbung (3.3.10.2) im Gel angefärbt. Die entsprechenden Banden werden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in 0,2 ml PCR-Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei diesem Schritt sowie bei allen folgenden Schritten zur Vorbereitung der Massenspektrometrie ist eine sehr saubere Arbeitsweise unerlässlich, um die Proben nicht z.B. mit Keratin aus Haar- oder Hautschuppen zu kontaminieren.

Zur Entfernung des Coomassie-Farbstoffs, SDS und Ionen, werden die Gelstücke zweimal alternierend für 5 Minuten mit Lösung A und B inkubiert. Die Menge der Lösungen wurde hier wie in allen folgenden Schritten so gewählt, dass die Gelstücke komplett bedeckt sind (ca. 100 µl). Nach diesem Waschschrift werden die Disulfidbrücken der Proteine in dem Gelstück reduziert, indem sie für 30 Minuten bei 56 °C in der Reduktionslösung (enthält DTT) inkubiert werden. Vor dem nächsten Schritt werden die Proben kurz in einer Tischzentrifuge (Spectrafuge Mini; Labnet, Woodbridge) abzentrifugiert und die Reduktionslösung abgenommen. Um die entstandenen Sulfhydrylgruppen an einer Wiederausbildung von Disulfidbrücken zu hindern, werden diese durch Inkubation im Alkylierungspuffer (30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln) alkyliert. Nach Abnehmen des Alkylierungspuffers wird noch zweimal abwechselnd mit Lösung A und B für je 5 Minuten gewaschen. Sollten im Anschluss an diese Waschschrift noch Coomassie-Reste in den Gelen vorhanden sein, wird auch noch ein weiteres Mal mit Lösung A und B gewaschen werden. Als Vorbereitung für den in-Gel-Verdau werden die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.7.2 Tryptischer Verdau der Proteine im Gel

In der Massenspektrometrie werden nicht die Proteine als Ganzes analysiert, sondern nur einzelne Peptide. Hierzu werden die Proteine vorher tryptisch verdaut, wobei die Protease Trypsin in der Aminosäuresequenz C-terminal hinter Arginin- und Lysinresten schneidet. Dadurch entsteht für jedes Protein ein charakteristisches Set von Peptiden mit einer bestimmten Sequenz und Molekülmasse (Peptidmassen-Fingerabdruck; PMF), die im Massenspektrometer analysiert und nach Datenbankabgleich dem ursprünglichen Protein zugeordnet werden können. Der Verdau erfolgt durch Zugabe der Trypsinlösung (12 ng/µl; Promega, Mannheim) zu den getrockneten Gelstücken. Die Menge ist dabei abhängig von der Größe des Gelstücks und variiert zwischen 6-9 µl. Das getrocknete Gelstück saugt sich mit der Trypsinlösung voll (ca. 15 Minuten) und der vollständige Verdau der Proteine im Gel findet über Nacht bei 37 °C im Heizblock (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg) statt.

3.7.3 Extraktion von Peptiden aus den Gelbanden

Nachdem die Proteine im Gel verdaut wurden, werden die entstandenen Peptide aus dem Gel isoliert. Dazu werden zu jeder Gelbande 20 µl eines Gemischs mit 2,5% Ameisensäure und 50% Acetonitril gegeben und die Proben anschließend für 15 Minuten im Ultraschallbad (elmasonic, Roth, Karlsruhe) inkubiert. Dabei gehen die Peptide in die Lösung über und können einfach abgenommen werden. Um die Ausbeute an isolierten Peptiden zu erhöhen, wird dieser Schritt noch einmal wiederholt. Bei dieser Art der Extraktion erhalten die Peptide aufgrund des sauren pH-Werts positive Ladungen, was später bei der Ionenbildung in der Massenspektrometrie wichtig ist. Die abgenommene Lösung wird in eine HPLC-Glasküvette überführt und in einer Vakuumzentrifuge auf 8 µl eingengt.

3.7.4 ESI-massenspektrometrische Analyse der extrahierten Peptide

Die chromatographische Auftrennung der Peptide und massenspektrometrische Analyse wurde von Dipl.-Biochem. Thomas Schulenburg durchgeführt. Die extrahierten Peptide werden zunächst über eine HPLC aufgetrennt, weil sich ansonsten, aufgrund der großen Zahl an Peptiden, die einzelnen Spektren überlagern würden. Dazu werden von jeder Probe aus den Glas-Küvetten im Autosampler 7,5 µl erst auf eine Vorsäule (Symmetry 300TM C₁₈ NanoEaseTM Trap Column; Waters) geladen. Dort binden die Peptide über hydrophobe Wechselwirkungen an das Säulenmaterial und werden somit angereichert. Nachdem sie mit 0,1% Ameisensäure gewaschen wurden (Fließgeschwindigkeit: 10 µl/Minute), wechselt das HPLC-Programm (MassLynx 4.0, Micromass, Waters) vom Injektions- in den Elutionsmodus

und die Peptide werden auf die mit ESI-Puffer A äquilibrierte Analysensäule (Atlantis dC₁₈ NanoEase™ Column) geladen. Bei dieser Reversed-Phase-HPLC mit Nano-LC-System werden die Peptide aufgrund ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Mit Hilfe eines Programms, bei dem graduell die Konzentration des organischen Lösungsmittels (Acetonitril) erhöht wird, werden zuerst schwach gebundene (wenig hydrophobe) Peptide eluiert und im Verlauf der ansteigenden Acetonitrilkonzentration erfolgt die Elution immer stärker gebundener (stark hydrophobe) Peptide. Das Gradientenprogramm für den 1 Stunden-Lauf ist in Tabelle 12 dargestellt, die Flussrate beträgt 200 nL/Minuten. Die gelösten Peptide werden dann in einem Tandem-Massenspektrometer mit Q-TOF-MS/MS-Analysator (Azo-Nanotechnology) und nanoESI-Ionenquelle (Micromass, Waters) identifiziert. Die Parameter, die für die massenspektrometrische Analyse verwendet wurden, sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Gradientenprogramm für einen 1 Stunden-Lauf zum Binden und Eluieren der Peptide an der HPLC-Analysesäule.

Zeit [min]	ESI-Puffer B [%]	Acetonitril [%]
0	0	0
5	0	0
5.1	5	4,75
40	60	57
45	100	95
48	100	95
48.1	0	0
60	0	0

Tabelle 13: Parameter für die massenspektrometrische Analyse von Peptiden

Parameter	Wert
Konusspannung	40 V
Kapillarenspannung	2.0-2.4 V
Anzahl der Vorläuferionen	3
Nachweisbereich eines Peaks	1Da
m/z-Bereich für MS	400-1600, Scanzeit: 1 s
m/z-Bereich für MS/MS	100-1600; Scanzeit: 0,9 s
Ladungszustände	ein-, zwei-, dreifach
Kollisionsenergie:	abhängig vom Ladungszustand

3.7.5 Auswertung der massenspektrometrischen Daten

Das Programm MassLynx 4.0 erfasst die im Massenspektrometer gemessenen Rohdaten, welche dann mit Hilfe der Software ProteinLynx 2.1 in das PKL-Format umgeschrieben werden. Zum Abgleich mit einer Datenbank wird das Programm Mascot Daemon 2.1 mit der Lizenz der Abteilung Tierphysiologie der Universität Kaiserslautern (AG Friauf) verwendet, wobei die einzelnen gemessenen Spektren und daraus resultierenden Peptide einem Protein mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (ausgedrückt über den "Score"-Wert) zugeordnet werden. Als Datenbank wird bei der Suche immer "IPI Human" ausgewählt, also eine Datenbank, in der speziell nur humane Proteine gesucht werden [Kersey et al., 2004] (Version vom 20.09.2009). Zusätzlich wird angegeben mit welchem Enzym die Proteine verdaut wurden (Trypsin/P) und dass dabei im gemessenen Peptid maximal eine Schnittstelle übersprungen sein darf. Als variable Modifikationen werden die Oxidation von Methioninen und eine Carbamidomethylierung der Cysteine angegeben. Die ausgewählte MS/MS-Toleranz beträgt 0,2 Da und die Peptidtoleranz 100 ppm. Als Ladung der Peptide werden sowohl einfach, zweifach als auch dreifach positive Ladungen zugelassen. Von den gefundenen Proteinen wurden nur die mit einem signifikanten Score (>36) weiter berücksichtigt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung von GST-TRPV5 Fusionsproteinen

Im Folgenden sollten sieben N-terminale und vier C-terminale Konstrukte des TRPV5 Proteins als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine hergestellt werden. Diese können zur Validierung der TRPV5 Antikörper und für GST-Pulldown-Experimente mit Plazentagewebe verwendet werden (Abb. 9).

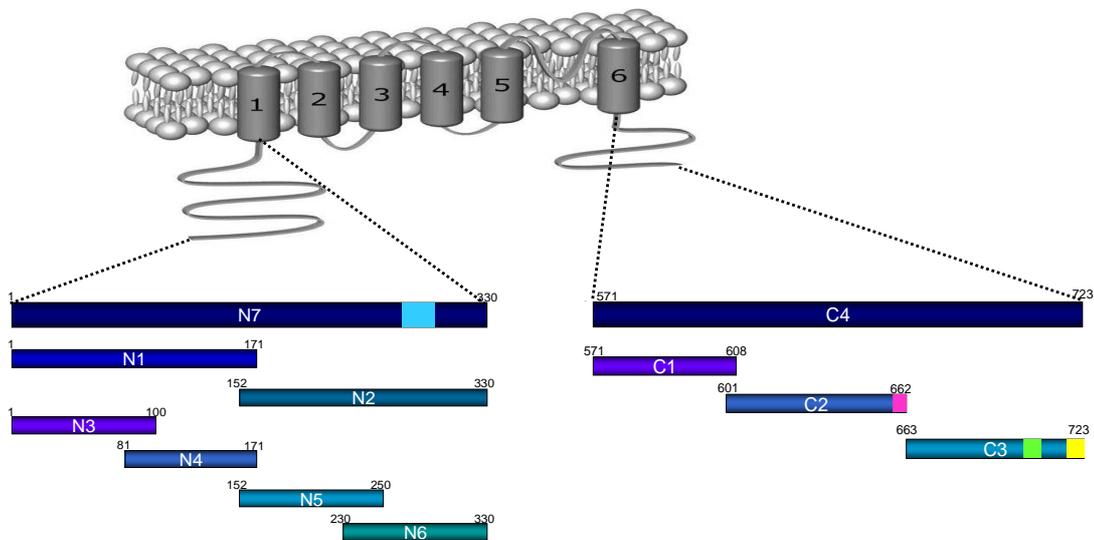


Abb. 9: Positionen der GST-TRPV5 Fusionsproteine im N- bzw. C-Terminus des TRPV5 Proteinsequenz. Die N-terminalen Proteine wurden mit Zahlen von 1-7 und dem Kürzel N benannt und entsprechend die C-terminalen Proteine mit Zahlen von 1-4 in Kombination mit C. Die eingezeichneten Kästen deuten die Lage der Peptide innerhalb der Fusionsproteine an, die für die Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung von Peptidantikörpern verwendet wurden. Die Zahlen bei den einzelnen Fusionsproteinen entsprechen jeweils der ersten und letzten Aminosäure. Blau: Peptid 1074; rosa: Peptid 1075; grün: Peptid 1052; gelb: Peptid 982.

Zur Klonierung der humanen TRPV5 cDNA wurde beim RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) ein cDNA Klon (ID: HU3.p983C04357D2) bestellt, der die komplette humane Sequenz im Vektor pCMV-Sport6 enthalten sollte. Die Größe des Inserts (ca. 2000 bp) stimmt auch annähernd mit der kompletten humanen TRPV5 Sequenz (2178 bp) überein. Allerdings ergab die DNA-Sequenzierung des Inserts im erhaltenen Plasmid, dass nur die kodierende Sequenz für die ersten acht Exons enthalten ist und anschließend die Sequenz eines Introns folgt, so dass die ersten 374 Aminosäuren (AS) bis hinter die erste Transmembrandomäne translatiert werden (Abb. 10A). Ein Alignment der in Aminosäuren übersetzten DNA-Sequenz zeigt, dass das Insert die korrekte Sequenz des humanen Gens (Gen-Bank Accession Nr. AJ271207) enthält (Abb. 10B). Allerdings ist an Position 154 ein Histidin durch ein Arginin im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz ausgetauscht, was auf einen natürlichen Einzelnukleotid-

Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) in der Gensequenz zurückzuführen ist. Zur Klonierung der C-terminalen TRPV5 Proteinfragmente wurde die Maus cDNA, die kloniert im Vektor pcDNA3 vorliegt (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Ulrich Wissenbach, Pharmakologie, Universität des Saarlandes) verwendet.

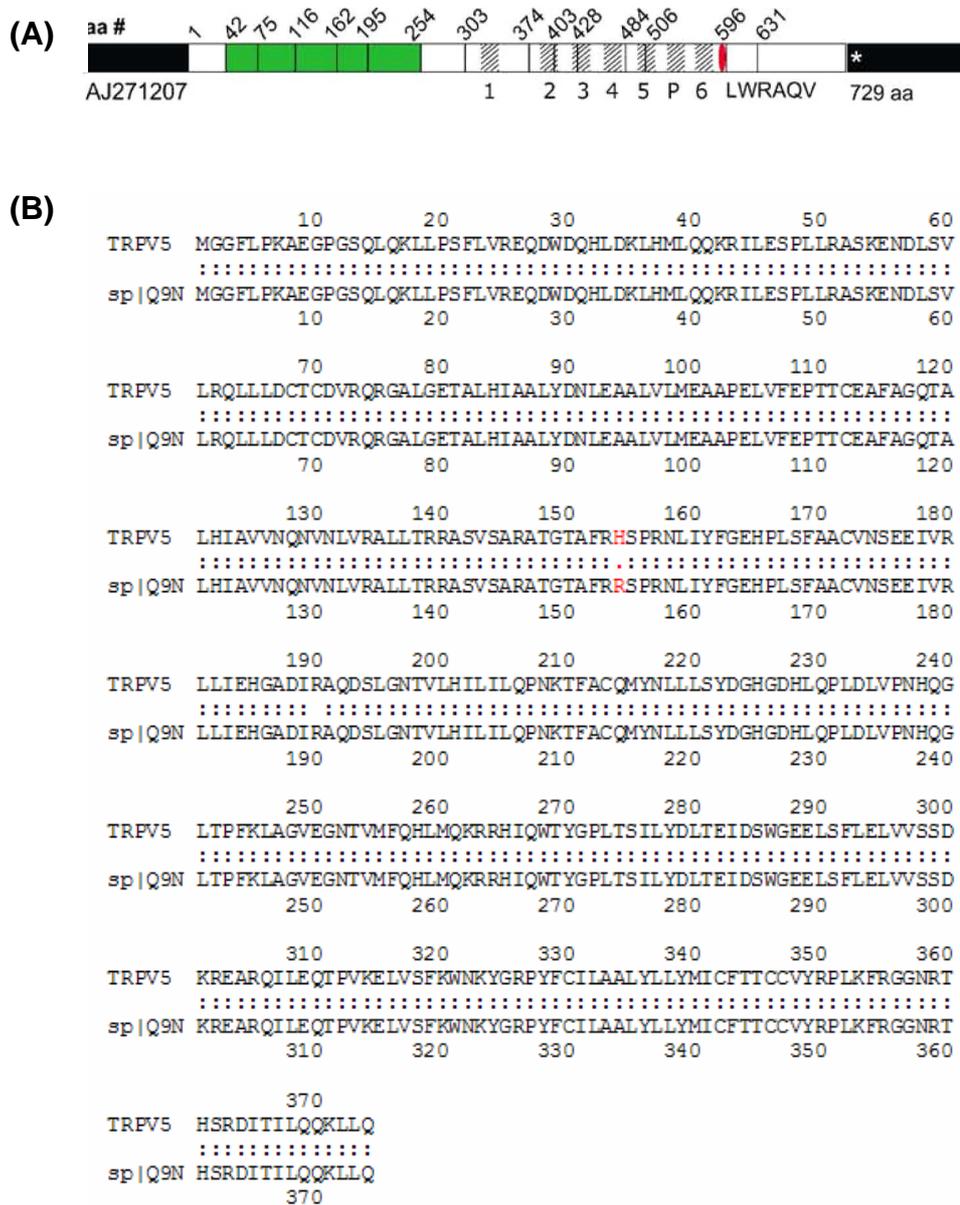


Abb. 10: Intron-Exon-Struktur und Aminosäure-Sequenz des humanen TRPV5

(A): Darstellung der Exons im offenen Leserahmen des TRPV5-Gens. Das Gen besteht aus 15 Exons mit insgesamt 729 Aminosäuren (AS), wobei die Zahlen oberhalb die Aminosäure-Positionen der Exon-Intron-Grenzen angeben, die Zahlen unterhalb und die schraffierten Kästen zeigen die 6 TM-Bereiche und die Poren-Region (P) an [Birnbaumer et al., 2003]. (B): TRPV5 Aminosäuresequenzvergleich der translatierten Sequenz des RZPD Klons (TRPV5) im Vergleich zum humanen Swiss Prot Eintrag (sp|Q9N) mit der Accession Nummer Q9NQA5. Der Klon umfasst die ersten 374 Aminosäuren von hTRPV5, was dem kompletten N-Terminus und der ersten TM-Domäne entspricht (siehe Teil A). An Position 154 (rot) ist der natürliche SNP (Arginin zu Histidin) von hTRPV5 gezeigt.

4.1.1 Klonierungsstrategie

Die einzelnen TRPV5 cDNA-Fragmente werden in einen Expressionsvektor direkt C-terminal hinter die cDNA-Sequenz von GST inseriert. Dazu wird in einer PCR-Reaktion die cDNA der einzelnen Fragmente mit den entsprechenden Primern (Tabelle 7 + Tabelle 8) amplifiziert. Zur Klonierung der N-terminalen Fragmente dient das pCMV-Sport6 Plasmid (humane TRPV5 Sequenz) als Matrize, die C-terminalen werden ausgehend vom pcDNA3-Plasmid amplifiziert, das die murine TRPV5 cDNA enthält. Durch die Primer erhalten die PCR-Produkte zusätzlich am 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bam*HI und am 3'-Ende eine *Not*I-Schnittstelle. Im Anschluss an die PCR erfolgt eine die Ligation in den "pJET1.2/blunt Cloning Vector" (3.1.5.1). Die Plasmide werden dann in kompetente *E.coli* XL1 blue-Bakterien transformiert (3.1.6), die Plasmid-DNA präpariert (3.1.7) und nach einem Restriktionsverdau (3.1.4, Kontrollverdau) mit *Bam*HI und *Not*I im Agarosegel analysiert. Es erfolgt ein quantitativer Verdau der DNA mit anschließender Auftrennung und Isolation aus dem Agarosegel (3.1.10). Die so erhaltenen, gereinigten Fragmente werden dann gerichtet in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pGEX-4T-2 ligiert (3.1.5.2), der vorher ebenfalls mit den beiden Restriktionsenzymen verdaut wurde. Der N-Terminus des TRPV5-Fragments wird dabei nur getrennt durch eine kurze Verbindungssequenz, die eine Thrombinschnittstelle enthält, an den C-Terminus der GST-cDNA eingefügt und die ligierten Plasmide werden in *E.coli* XL1 blue-Bakterien transformiert (3.1.6). Die Plasmid-DNA wird auch hier präpariert (3.1.7) und anschließend sequenziert (3.1.12), bevor diese dann in kompetente *E.coli* BL21 pLysS-Bakterien transformiert wird. Der Ablauf der einzelnen Klonierungsschritte ist in Abb. 11 zusammengefasst, die Bezeichnung der einzelnen Fusionsproteine sowie deren Größen sind in Tabelle 14 angegeben.

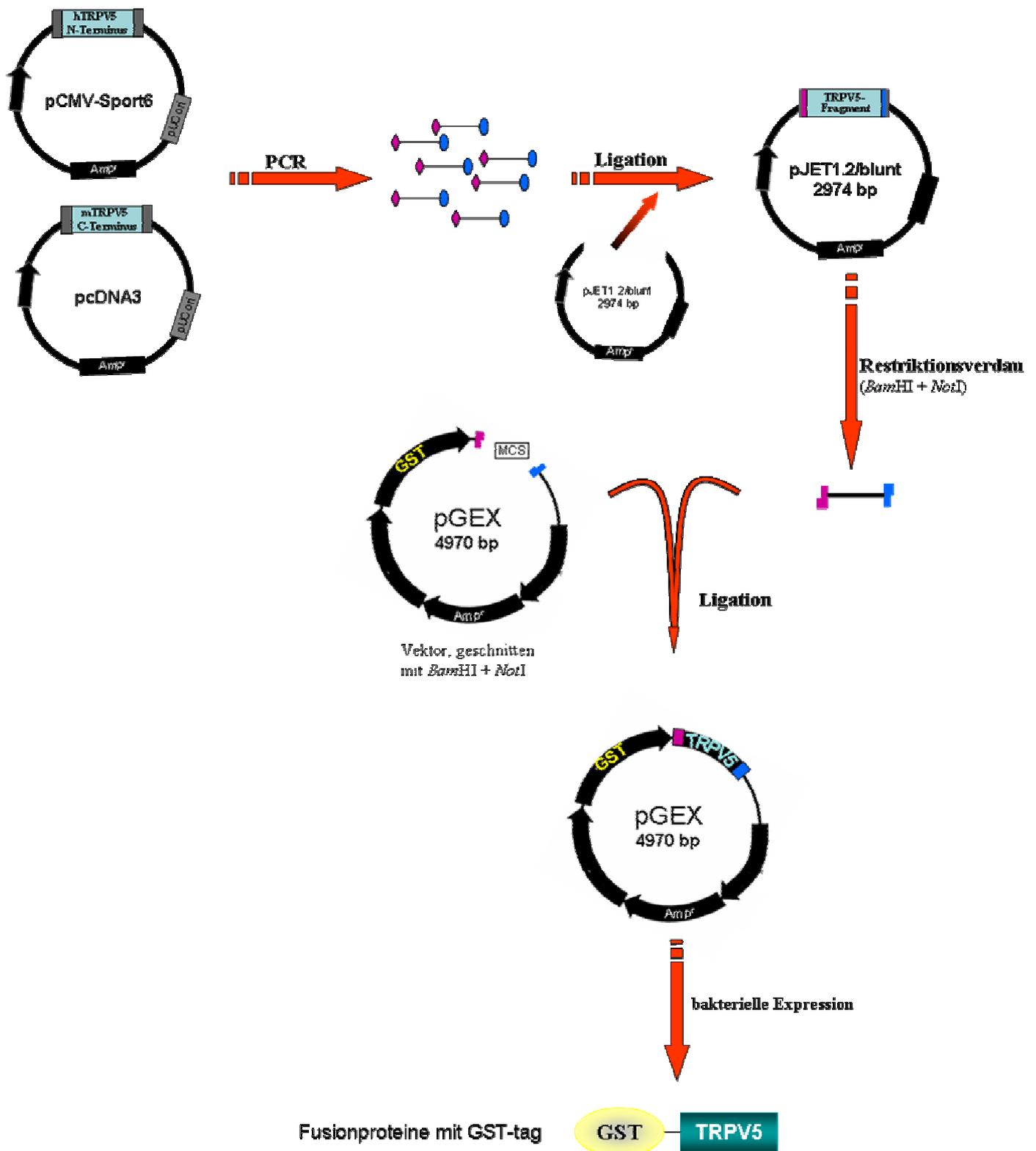


Abb. 11: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Plasmide für die Expression der GST-TRPV5-Fusionsproteine. Ausgehend vom Plasmid pCMV-Sport6 mit der humanen TRPV5-Sequenz oder dem pcDNA3-Plasmid mit der murinen TRPV5-Sequenz werden in einer PCR mit den entsprechenden Primern die einzelnen TRPV5-Fragmente amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI (5'Ende, rosa dargestellt) und *Not*I (3'Ende, blau dargestellt) angefügt. Nach einer Blunting-Reaktion werden die Fragmente in den bereits linearisierten Vektor pJET1.2/blunt ligiert und aus diesem mit den beiden Enzymen *Bam*HI und *Not*I ausgeschnitten. Die über ein Agarosegel aufgereinigten Fragmente werden anschließend mit dem pGEX-4-T2-Vektor ligiert, der ebenfalls mit den beiden gleichen Restriktionsenzymen innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) geschnitten ist, welche direkt hinter der cDNA für die Glutathion-S-Transferase (GST, gelb) liegt. Dieses Konstrukt wird in Bakterien exprimiert um die GST-TRPV5-Fusionsproteine zu erhalten.

Tabelle 14: TRPV5 Fusionsproteine. Angegeben sind jeweils der Name des Fusionsproteins (N steht für ein N-terminales Fragment, C für C-terminale Fragmente), die Länge des Fragments in Basenpaaren (bp) die Lage innerhalb der Aminosäure-Sequenz, sowie das ungefähre Molekulargewicht (MW) als GST-Fusionsprotein.

TRPV5-Fragment	Länge [bp]	AS-Position in TRPV5 (human bzw. Maus)	MW GST-TRPV5-Fusionsprotein [kDa]
N1	513	1-171 (171 AS)	46
N2	537	152-330 (179 AS)	47,6
N3	300	1-100 (100 AS)	38
N4	273	81-171 (91 AS)	37
N5	297	152-250 (99 AS)	38
N6	297	230-330 (99 AS)	39
N7	990	1-330 (330 AS)	64
C1	114	571-608 (38 AS)	31
C2	186	601-662 (62 AS)	33,5
C3	183	663-723 (61 AS)	33
C4	459	571-723 (153 AS)	43,6

4.1.2 Expression und Aufreinigung der GST-TRPV5 Fusionsproteine

Die Klonierung und Expression von GST TRPV5-C1 und C4 wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Nicole Seißler [2008] bereits durchgeführt. Die Lage der einzelnen Fusionsproteine innerhalb des TRPV5-Proteins, die in Tabelle 14 beschrieben sind, ist in Abb. 9 dargestellt.

Zum Austesten, ob die klonierten Konstrukte die gewünschten GST-Fusionsproteine exprimieren, wird zunächst von allen transformierten Klonen eine Testexpression (50 ml Kulturmedium) (3.2.1) durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Der Expressionsverlauf wird in einer SDS-PAGE (3.3.9.3) mit anschließender Coomassie-Färbung (3.3.10.1) analysiert (Abb. 12).

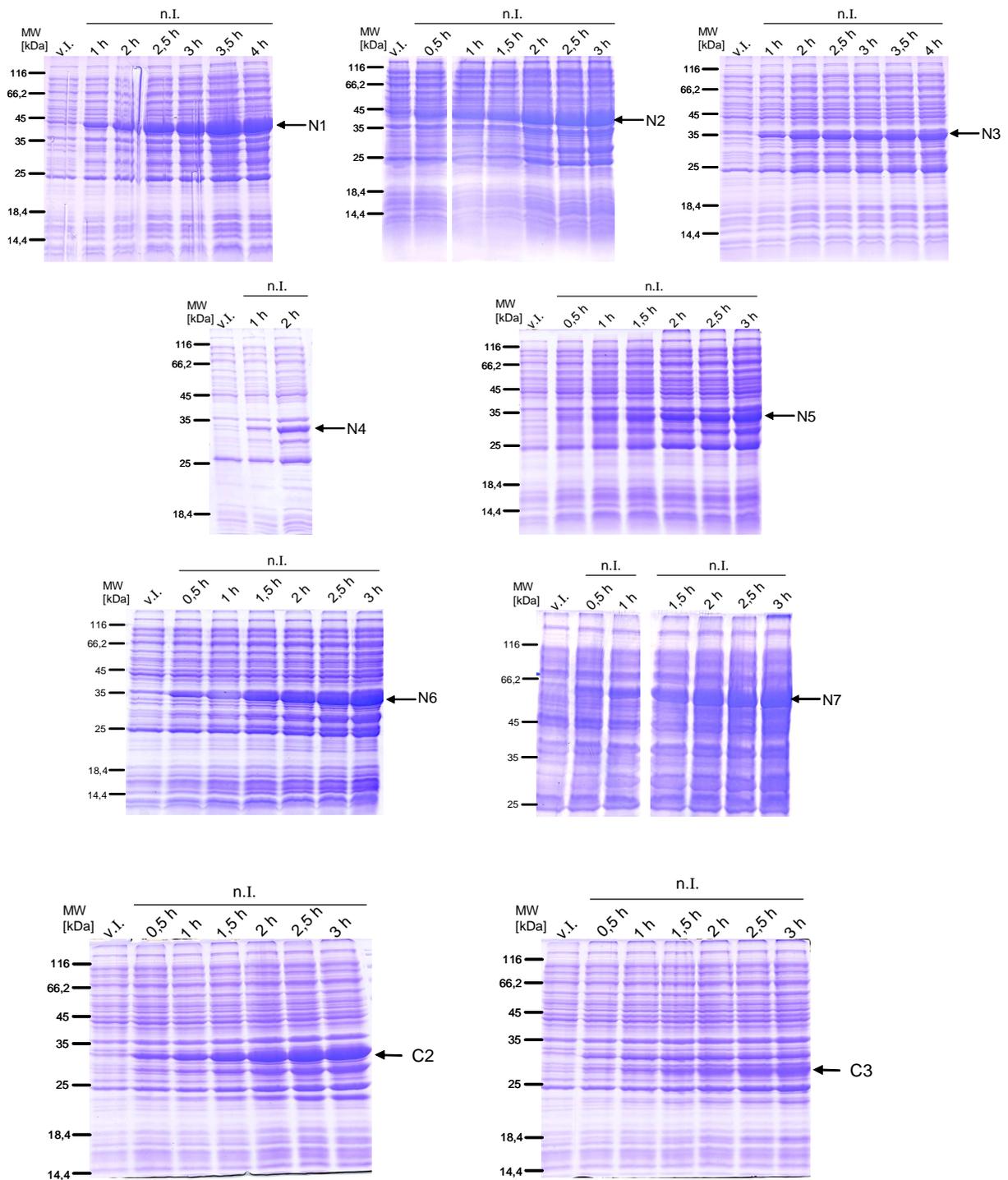


Abb. 12: Testexpressionen der N- und C-terminalen TRPV5 Fusionsproteine.

Die sieben Fusionsproteine werden in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert mit 0,1 mM IPTG induziert. Vor der Induktion und zu mehreren Zeitpunkten nach der Induktion wird von der Kultur 1 ml entnommen, abzentrifugiert und das entstandene Bakterienpellet in 100-150 μ l 2x SDS-Ladepuffer resuspendiert und denaturiert. Es werden jeweils 5 μ l auf ein 12% SDS-Gel (N2-6 und C2, C3) bzw. 10 % SDS-Gel (N1 und N7) aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt. v.I., Probe vor Induktion; n.I. Probe nach Induktion. Die Zeiten nach der Induktion sind in Stunden (h) angegeben.

Hierbei zeigte sich, dass alle N-terminalen Fusionsproteine nach der Induktion mit IPTG exprimiert werden, da für alle Fusionsproteine eine Zunahme der Proteinkonzentration nach Induktion mit IPTG zusehen ist (Abb. 12). GST-N1 wird bei einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa exprimiert mit der stärksten Expressionsrate nach 3,5 Stunden. Danach nimmt die Menge an Protein ab und zwischen zwei und drei Stunden nach der Induktion bleibt die Expressionsrate des Fusionsproteins gleich. GST-N2 wird ebenfalls bei einem Molekulargewicht von 45 kDa exprimiert, allerdings werden zusätzlich viele andere bakterielle Proteine ebenfalls stark exprimiert, so dass die Unterschiede nicht so deutlich auffallen wie bei N1. Die Expression des N3-Fusionsproteins ist bei etwa 35 kDa zu sehen, ebenso wie für die Fusionsproteine N4, N5 und N6. N7 zeigt bei etwa 64 kDa ein ähnliches Expressionsmuster wie N2. Die beiden C-terminalen Fusionsproteine C2 und C3 konnten auch erfolgreich exprimiert werden (beide ca. 33 kDa) wobei die Menge an C2-Protein etwas größer ist, als die von C3 (Abb. 12).

Nach den erfolgreichen Testexpressionen werden alle Fusionsproteine im präparativen Maßstab (400 ml Kultur, 3.2.1) exprimiert und über ihren GST-tag mit Glutathion (GSH)-Agarose affinitätsgereinigt (3.2.2). Die Reinigung verläuft nicht bei allen Fusionsproteinen erfolgreich. So werden bei N2 nur extrem geringe Mengen des Fusionsproteins bei der Aufreinigung von der GSH-Säule eluiert (<10 µg aus 400 ml Kulturmedium) und bei den beiden Fusionsproteinen N4 und N6 wird trotz der Konzentration des Eluats durch Ultrafiltration kein GST-TRPV5 Fusionsprotein im SDS-Gel detektiert. Die anderen Proteine lassen sich aufreinigen und die erzielten Ausbeuten aus einer 400 ml Kultur (ermittelt im Coomassie- gefärbten SDS-Gel durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen an BSA) sind exemplarisch in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Proteinausbeuten der GST-TRPV5-Fusionsproteine. Die Proteine wurden durch Glutathion-Affinitätschromatographie aus einer 400 ml Bakterienkultur aufgereinigt und die Eluate aufkonzentriert. Aus der im SDS-Gel ermittelten Konzentration und der Menge des Eluats wird die Ausbeute errechnet.

TRPV5-Fragment	Proteinausbeute aus 400 ml Bakterienkultur	TRPV5-Fragment	Proteinausbeute aus 400 ml Bakterienkultur
N1	200µg	C1	200µg
N2	<10µg	C2	500µg
N3	850µg	C3	1500µg
N4	--	C4	150µg
N5	250µg		
N6	--		
N7	800µg		

Wie aus der Tabelle zu sehen ist, lassen sich die Fusionsproteine N3, N7 und C3 mit Ausbeuten zwischen 1500 μg und 800 μg am besten aufreinigen. Für die anderen Proteine werden Ausbeuten zwischen 150-500 μg pro 400 ml Bakterienkultur erzielt.

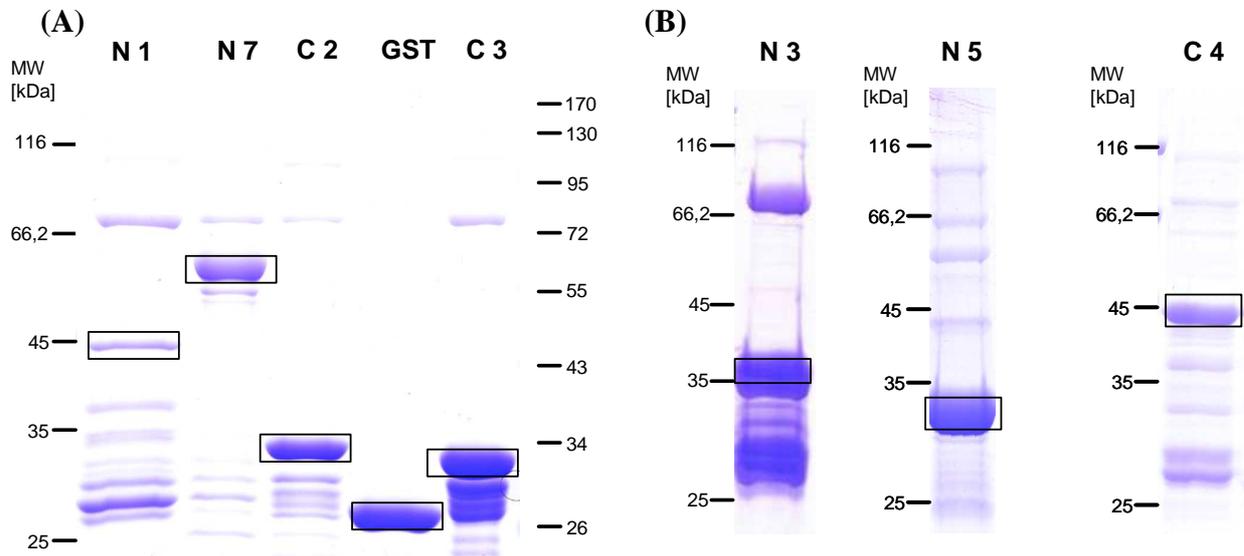


Abb. 13: Exprimierte GST-TRPV5 Fusionsproteine.

(A) Coomassie-gefärbtes 10% SDS-Gel mit TRPV5 Fusionsproteinen, die für die Validierung der TRPV5 Antikörper eingesetzt werden. Von N1 sind 2 μg aufgetragen, von allen anderen TRPV5 Proteinen sowie GST 3 μg . Proteinmarker links: PeqGOLD; Marker rechts: PageRuler Prestained. (B) Coomassie-gefärbte SDS-Gele mit Fusionsproteinen die in A nicht gezeigt sind, aber auch aufgereinigt werden konnten. 12% SDS-Gele mit den Fusionsproteinen N3 (10 $\mu\text{l}/\sim 8 \mu\text{g}$) und N5 (10 $\mu\text{l}/\sim 7 \mu\text{g}$) und C4 (10 $\mu\text{l}/\sim 2,5 \mu\text{g}$).

Alle gezeigten GST-TRPV5 Fusionsproteine werden bei dem erwarteten theoretischen Molekulargewicht (Tabelle 14) exprimiert (Abb. 13). Die Proteine zeigen alle unterhalb ihres Vollängen-Produktes Abbaubanden, deren Menge je nach Protein stark variiert. So sind bei N1, N3, C2 und C3 viele kleinere Abbaufragmente vorhanden dahingegen bei N7, N5 und C4 nur wenige. Ein Protein (66 kDa), das in allen Spuren außer bei GST und C4 auftaucht, ist auf eine bakterielle Verunreinigung zurückzuführen.

4.2 TRPV5-Antikörper

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression und Zusammensetzung des TRPV5-Ionenkanals insbesondere in der humanen Plazenta untersucht werden. Von diesem Gewebe war zu Beginn der Arbeit bekannt, dass dort TRPV5 Transkripte vorhanden sind [Hoenderop et al., 1999]. Das Protein konnte bisher aber noch nicht eindeutig in dem Gewebe nachgewiesen werden. Da keine Agonisten oder Liganden bekannt sind, die mit hoher

Affinität an das TRPV5 Protein binden, soll das Protein mit Hilfe von spezifischen Antikörpern angereichert werden. Spezifische kommerzielle Antikörper waren zu Beginn meiner Arbeit nicht erhältlich, weshalb selbst TRPV5-Antikörper in Kaninchen generiert und diese auf ihre Spezifität untersucht werden.

4.2.1 Auswahl von antigenen Peptiden

Insgesamt werden aus der Aminosäure-Sequenz des humanen TRPV5 Proteins vier Bereiche ausgewählt, gegen die Peptid-Antikörper generiert werden. Die Kaninchen werden dazu mit synthetischen Peptiden der entsprechenden Sequenz immunisiert und die Seren anschließend mit verschiedenen Methoden auf spezifische Antikörper untersucht. Die Auswahl der einzelnen Sequenzbereiche ist bereits im Methodenteil beschrieben (3.4.1). Die antigenen Sequenzbereiche sind nicht innerhalb der TM-Domänen lokalisiert und sind spezifisch für TRPV5, damit die generierten Antikörper nicht mit anderen TRP-Proteinen, insbesondere dem eng verwandten TRPV6 Protein (75% Homologie auf AS-Ebene, siehe Einleitung) kreuz reagieren.

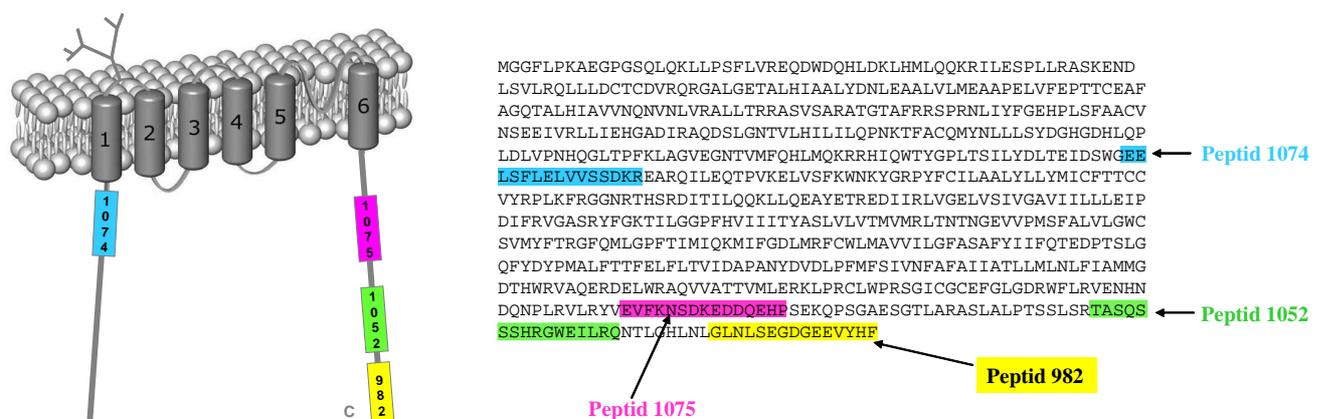


Abb. 14 Lage der TRPV5 Antikörper-Peptide innerhalb der Proteinsequenz.

Im linken Teil der Abbildung ist schematisch die Struktur des TRPV5-Proteins dargestellt und farblich die Lage der Peptide und somit die Epitope, die die Antikörper erkennen dargestellt. Im rechten Teil ist die humane TRPV5 Sequenz gezeigt, mit farblich hinterlegter Sequenz der vier Antikörper-Epitope. Blau: 1074; rosa: 1074; grün: 1052;

In Tabelle 16 ist ein Sequenzvergleich von TRPV5 aus verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen) und mit der humanen TRPV6 Sequenz gezeigt. Die vier humanen Peptide werden zur Immunisierung der Kaninchen verwendet und dabei insgesamt 60 verschiedene Seren von den einzelnen Blutentnahmen gewonnen. Da bei den Immunisierungen der ersten beiden Kaninchen mit dem Peptid 982 keine TRPV5-spezifischen Antikörper gebildet wurden (982/1 und 982/2), werden in dieser Arbeit

vorwiegend Seren des dritten Tieres charakterisiert (982/3). Zusätzlich sind aber noch zwei weitere Tiere mit dem Peptid 982 immunisiert worden (982/4 und 982/5). Mit den drei Peptiden 1052, 1074 und 1075 wurde jeweils nur ein Tier immunisiert und die Seren getestet.

Tabelle 16: Peptide zu TRPV5-Antikörper-Generierung.

Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen des TRPV5 aus verschiedenen Spezies und der Sequenz vom humanen TRPV6. Die orange-markierten Aminosäuren zeigen Abweichungen zur humanen TRPV5 Sequenz (fett, schwarz), die dem immunisierten Peptid entspricht.

Peptid/ Antikörper- Bezeichnung	Lage; AS Position	Peptidlänge	AS-Sequenz (N→C)
982	abs. C- Terminus; AS 715-729	15 Aminosäuren	Mensch: GLNLSEGDGEEVYHF Ratte: GQDLGEGDGEEIYHF Maus: GLDPGEGDGEEIYQF Kaninchen: GLDLGEGDGEEVYHF hTRPV6: INRGLEDGESWEYQI
1052	C-Terminus; AS 691-706	16 Aminosäuren	Mensch: TASQSS-SHRGWELLRQ Ratte: TTSLSSNSHRGWELLRR Maus: TTSLSSNSHRGWELLRR Kaninchen: TTSQSSNSHRGWELLRR hTRPV6: STSRSS---ANWERLRQ
1074	N-Terminus; AS 288-302	15 Aminosäuren	Mensch: EELSFLELVVSSDKR Ratte: EDLSFLELVVSSKKK Maus: EELSFLELVVSSKKK Kaninchen: EELSFLELVVSSKKR hTRPV6: DEQSLELELIITTKR
1075	C-Terminus; AS 649-663	15 Aminosäuren	Mensch: EVFKNSDKEDDQHP Ratte: EAFKSSDKEEVQEQL Maus: EAFKSSDKEEVQEQL Kaninchen: EAFKCSDKEDGQEQL hTRPV6: QAFHTRGSEDLDKDS

4.2.2 Durchführung von ELISA-Tests

Einen Hinweis auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper in den einzelnen Seren liefert der ELISA. Dabei wird das Peptid, wie in diesem Fall 982, das zur Immunisierung genutzt wurde, an die beschichtete Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden, die nicht aufgereinigten Antikörperseren in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und nach einer Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper-Inkubation eine Farbreaktion ausgelöst, bei der die Farbintensität proportional zur Menge an gebundenem Antikörper ist (3.4.2). Dazu werden erst vier verschiedene Arten der Beschichtung der Mikrotiterplatten (Maxisorp, Multisorp, Polysorp und Medisorp) getestet, die alle unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen. Dabei wird das beste Signal/Rausch-Verhältnis bei den Platten mit der Multisorp-

Beschichtung erreicht (Ergebnisse nicht gezeigt), weshalb diese für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

4.2.2.1 ELISA mit den 982-Seren

Zum Testen der 982-Seren auf spezifische Antikörper werden ELISAs mit den Seren der einzelnen Blutentnahmen wie beschrieben (3.4.2) durchgeführt (Abb. 15). Bei allen getesteten Seren ist zu sehen, dass die gemessenen Absorptionswerte für die einzelnen Seren immer größer sind, als das entsprechende Präimmunserum, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Seren Antikörper gegen das entsprechende TRPV5-Peptid enthalten. Bei den Seren der Tiere 3 und 4 sind die Absorptionswerte insgesamt höher, als bei Tier 5, so dass in den beiden ersten Tiere der Titer aufgrund einer stärkeren Immunreaktion wahrscheinlich höher ist. Insgesamt kann daraus geschlossen werden, dass alle Tiere peptidspezifische Antikörper gebildet haben. Deshalb wird im Folgenden getestet, ob diese Antikörper auch für den Nachweis des endogenen, im Gewebe exprimierten TRPV5-Proteins und Immunpräzipitationen (IP) geeignet sind.

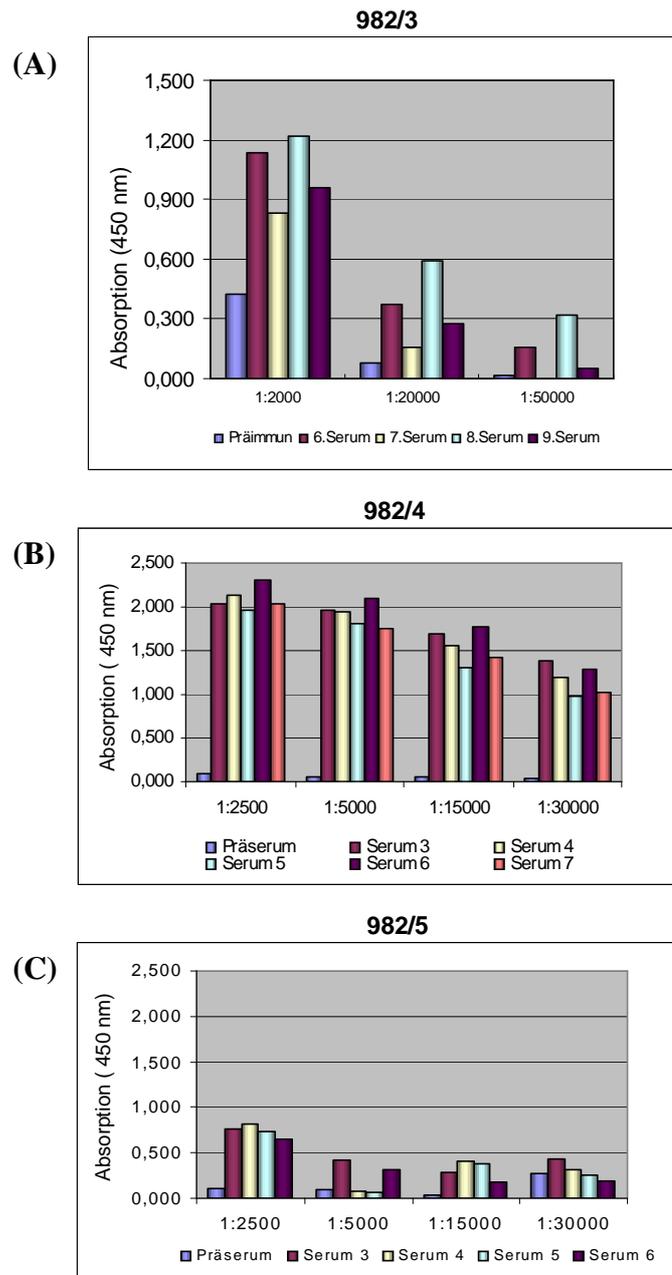


Abb. 15: ELISA mit 982 Seren.

Die Multisorp ELISA-Platten wurden mit dem Peptid 982 gekoppelt und die verbleibenden Bindestellen geblockt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den Seren in verschiedenen Verdünnungen für 1 h. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper (anti-rabbit-HRP 1:50000) wurde die Bindung des Erstantikörpers in einer Farbreaktion mit TMB und Wasserstoffperoxid visualisiert. Die Intensität der Färbung wurde im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen und graphisch dargestellt. (A) Antikörperseren 6-9 und Präimmunserum von 982/3, eingesetzte Verdünnungen 1:2000; 1:20000; 1:50000). (B) Antikörperseren 3-7 und Präimmunserum von 982/4, eingesetzte Verdünnungen 1:2500; 1:5000; 1:15000; 1:30000). (C) Antikörperseren 3-6 und Präimmunserum von 982/5, eingesetzte Verdünnungen 1:2500; 1:5000; 1:15000; 1:30000).

4.2.3 Charakterisierung der Antikörperseren 982/3 durch Western Blot-Analysen

Zum Testen der Seren auf spezifische TRPV5-Antikörper werden Western Blots mit Zellysaten von transfizierten HEK (**H**uman **E**mbrionic **K**idney)-Zellen oder humane Plazentamikrosomen eingesetzt. Die HEK-Zellen wurden mit der Maus-TRPV5-cDNA

transfiziert und als Kontrolle dienen untransfizierte HEK-Zellen. Die ersten Seren, die zur Verfügung stehen, sind vom Peptid 982 abgeleitet, und anhand dieses Antikörpers wird exemplarisch das Testen auf vorhandene Antikörper im Western Blot dargestellt (Abb. 16).

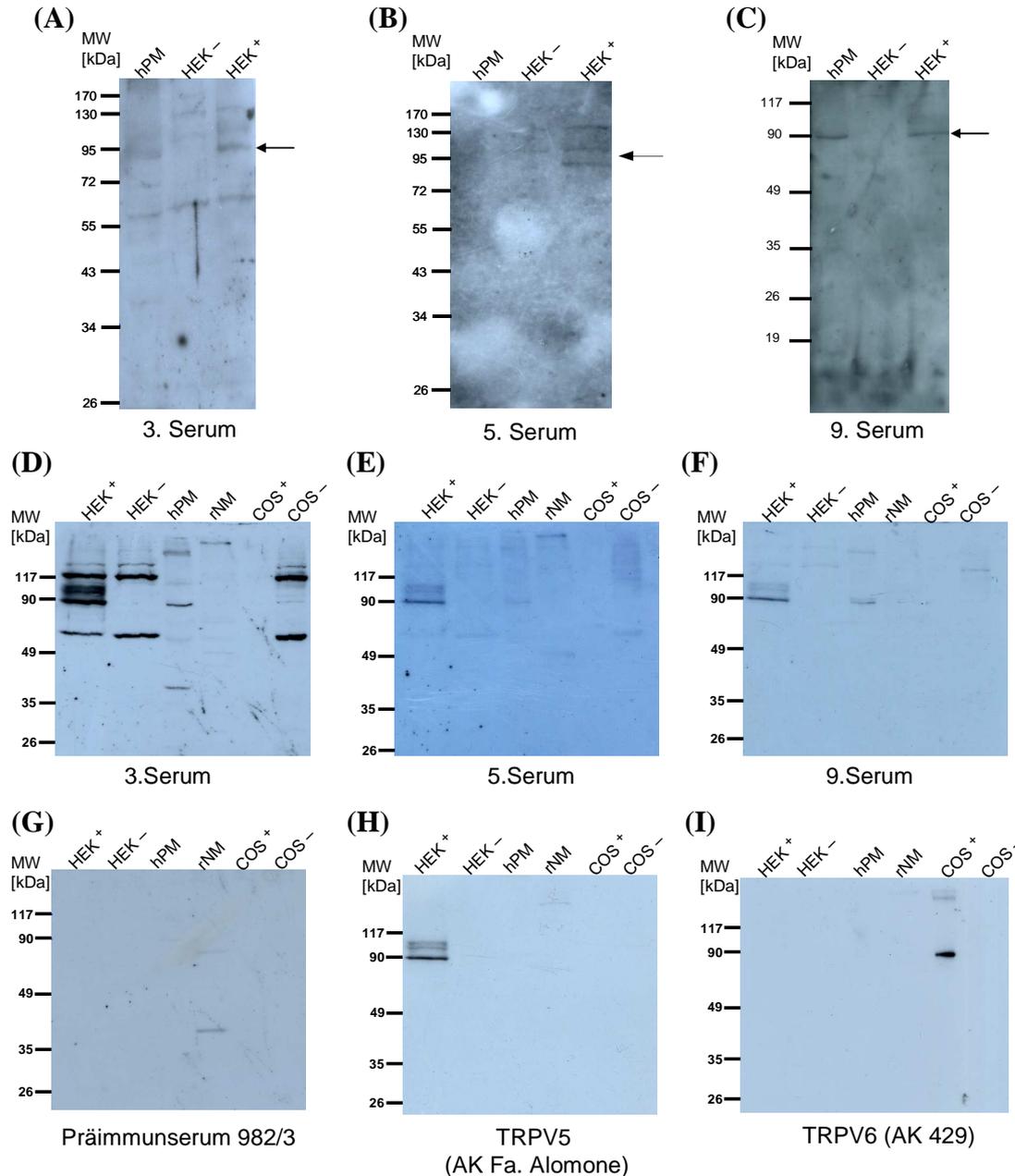


Abb. 16: Austesten der Antikörper Seren 982/3 im Western Blot.

10% SDS-Gele mit verschiedenen Proben wurden in Western Blots mit den Seren 3, 5, und 9 (1:300 verdünnt in 1% BSA) sowie den affinitätsgereinigten AK der Seren 3, 5, und 9 (10 µg/ml) inkubiert. (A) Inkubation mit dem 3. Serum; (B) Inkubation mit dem 5. Serum; (C) Inkubation mit dem 9. Serum; (D) Inkubation mit dem gereinigten 3. Serum; (E) Inkubation mit dem gereinigten 5. Serum; (F) Inkubation mit dem gereinigten 9. Serum; (G) Inkubation mit dem Präimmunsereum 982/3; (H) Inkubation mit dem TRPV5-AK der Firma Alomone; (I) Inkubation mit dem TRPV6-AK 429. Sekundärantikörper: jeweils Anti-rabbit HRP (1:50000); hPM: 75 µg humane Plazentamikrosomen HEK⁻: untransfizierte HEK-Zellen; HEK⁺: mit der Maus TRPV5-cDNA transfizierte HEK-Zellen; rNM: Ratten-Nierenmikrosomen; COS⁺: mit der humanen TRPV6-cDNA transfizierte COS-Zellen; COS⁻: COS-Leerzellen

Bei Inkubation des Western Blots mit dem Präimmunserum (Abb. 16 G), welches dem Tier vor der ersten Immunisierung entnommen wurde, ist erwartungsgemäß keine Proteinbande zu erkennen, da das Tier vorher keine TRPV5-spezifischen Antikörper gebildet hat. Bei Inkubation des Western Blots mit dem 3. Serum (Abb. 16 A) ist auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von TRPV5 bei etwa 83 kDa ein Signal sowohl in den Plazentamikrosomen zu erkennen, als auch in den transfizierten HEK-Zellen, aber nicht in untransfizierten Zellen. Mit dem 5. Serum (Abb. 16 B) sind diese Banden nicht zu erkennen, da dieses Serum insgesamt ziemlich viele Hintergrundsignale produziert. In der Spur mit den transfizierten HEK-Zellen sind Signale beim entsprechenden Molekulargewicht aufgetreten, die aber nicht eindeutig zuzuordnen sind. Im Serum der 9. Blutentnahme (Abb. 16 C) sind ähnliche Banden zu erkennen, wie im dritten Serum in den Plazentamikrosomen und eindeutige Signale in den TRPV5-transfizierten Zellen. Allerdings ist auch bei diesem Serum der Hintergrund stark und die Signale dieser ungereinigten Seren sind insgesamt schwach. Durch eine Affinitätsreinigung der Seren über das entsprechende immobilisierte antigene Peptid werden unspezifische Antikörper und störende Proteine aus den Kaninchenseren abgereichert und der spezifische TRPV5 Antikörper angereichert. Diese Seren werden anschließend ebenfalls im Western Blot analysiert (Abb. 16 D-E). Zusätzlich zu den ersten Blots werden auf diesen noch Mikrosomen aus Rattennierenmikrosomen aufgetragen, da TRPV5 in Nieren laut Literatur [Muller et al., 2000a] am stärksten exprimiert ist, sowie COS-Zellen (CV-1 in Origin carrying the SV40 genetic material), die mit der humanen TRPV6-Sequenz transfiziert sind. Mit diesen Zellen wird die Spezifität untersucht, um zu überprüfen, inwiefern der Antikörper das eng verwandte TRPV6-Protein erkennt. Das dritte affinitätsgereinigte Serum (Abb. 16 D) detektiert in den transfizierten HEK-Zellen und in den Plazentamikrosomen eine Doppelbande bzw. eine einzelne Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa, die in allen anderen Proben nicht zu sehen ist, weder in den untransfizierten Zellen, noch in den TRPV6-transfizierten Zellen. Allerdings wird auch in den Rattennierenmikrosomen kein entsprechendes Signal detektiert. Ein ähnliches Bandenmuster zeigt sich bei dem 5. affinitätsgereinigten Serum (Abb. 16 E), wobei die Signale insgesamt etwas schwächer sind, aber eindeutig die beschriebenen Banden bei ca. 90 kDa auftauchen. Im Western Blot mit dem 9. Serum (Abb. 16 F) sind wesentlich weniger Hintergrundsignale aufgetreten, als bei den beiden anderen Seren und die 90 kDa-Banden sind deutlich zu erkennen. Ebenfalls wird kein spezifisches Signal in den TRPV6-transfizierten Zellen detektiert. Im Vergleich dazu zeigt der Alomone Antikörper (Abb. 16 H), als ein kommerzieller Antikörper, der das gleiche Epitop wie der Antikörper 982/3 erkennen sollte

(vgl. Abb. 14), nur Signale in den transfizierten HEK-Zellen, aber keine im nativen Plazentagewebe. Durch Inkubation des Blots mit einem TRPV6-spezifischen Antikörper (429; Abb. 16 I) ist nachgewiesen, dass die transfizierten COS-Zellen tatsächlich das TRPV6 Protein exprimieren und damit gleichzeitig gezeigt, dass der TRPV5-Antikörper das TRPV6 Protein nicht erkennt.

4.2.4 Epitop-Bestimmung von Antikörper 982 und Alomone mit Peptidblots

In den Western Blot Analysen wurde zuvor gezeigt, dass der Antikörper 982/3 zwar das endogene TRPV5 Protein in der humanen Plazenta erkennt, aber der kommerzielle Antikörper (Alomone) nicht, obwohl beide Antikörper gegen das gleiche Peptid gerichtet sind. Zur Beurteilung der Spezifität von beiden Antikörper, d.h. gegen welche Aminosäuren-Bereiche des TRPV5 Proteins die Antikörper gebildet wurden, wird ein Peptidblot mit den verschiedenen Antikörper-Lösungen inkubiert. Bei diesem Blot ist die komplette TRPV5-Aminosäuresequenz als Peptide mit jeweils 10 Aminosäuren auf einer Membran fixiert, wobei sich benachbarte Peptide um fünf Aminosäuren überlappen. Aufgrund der bekannten AS-Sequenz der einzelnen Spots kann daraus auf das erkannte Epitop des Antikörpers geschlossen werden. Wie in Abb. 17 deutlich zu sehen ist, sind die Spots mit den stärksten Signalen sowohl beim Antikörper 982/3 (A) als auch beim kommerziellen Alomone-Antikörper (B) die letzten drei C-terminalen Peptide (F18-20) innerhalb der TRPV5 Sequenz. Bei Antikörper 982/3 nimmt die Affinität, mit der die Peptide erkannt werden vom letzten zum drittletzten Spot ab, wohingegen sie beim Antikörper der Firma Alomone bei allen drei Peptiden gleich stark ist. Die Aminosäure-Sequenzen dieser drei Peptide sind in Abb. 17 D noch einmal dargestellt. Andere Peptide der TRPV5-Sequenz werden ebenfalls, vor allem von Antikörper 982/3, erkannt. Ein Teil der Peptide kann dabei durch die Zweitantikörperkontrolle (Abb. 17 C) ausgeschlossen werden. Die anderen Spots zeigen keine Homologie in der AS-Sequenz zum 982-Peptid. Allerdings sind die Signale in diesen Bereichen auch wesentlich schwächer, als die für die letzten drei Spots, die der erwarteten Bindungsstelle entsprechen.

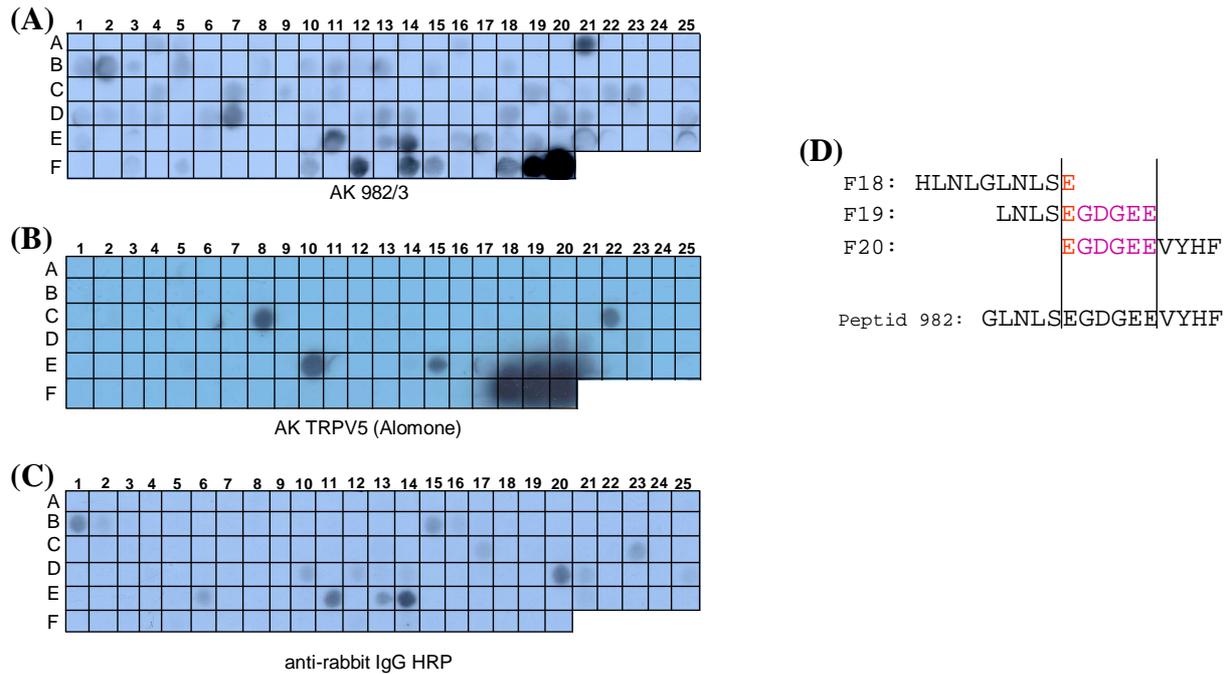


Abb. 17: Epitopbestimmung für Antikörper 982 mittels Peptidblots.

Auf dem Peptidblot ist die komplette humane TRPV5 Aminosäuren-Sequenz in 10er Peptide mit jeweils 5 Aminosäuren Überlappung auf einer Membran aufgespottet. Die Membran wird ähnlich einem Western Blot mit dem zu testenden Antikörper inkubiert und anschließend mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit-HRP (1:50000) entwickelt. (A) Inkubation des Blots mit Antikörper 982/3 (1:300); (B) Inkubation mit dem TRPV5 AK der Firma Alomone; (C) Sekundärantikörperkontrolle mit anti-rabbit-HRP 1:50000; (D) Sequenz der Peptide F18-20, die in (A) und (B) die stärksten Signale zeigen. Rot markierte Aminosäure: ist in allen drei Spots enthalten; rosa markierte Aminosäuren sind in den letzten beiden Spots überlappend; unterste Zeile: Peptidsequenz 982.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die gebildeten Antikörper gegen das immunogene Peptid gerichtet sind, allerdings werden auch andere Aminosäuren-Bereiche ohne Homologie zu dem antigenen Peptid unspezifisch erkannt. Obwohl laut Angabe der Firma Alomone das gleiche Peptid zur Immunisierung verwendet wurde, unterscheiden sich die Antikörper in ihrer Affinität und Spezifität, was die Ergebnisse aus Abb. 16 H bestätigt.

4.2.5 Nachweis von TRPV5 in verschiedenen Geweben

Nachdem die Spezifität des Antikörpers 983/3 für TRPV5 im Western Blot bestätigt wurde, soll nun überprüft werden, ob sich TRPV5 in verschiedenen Geweben nachweisen lässt. Bisher gibt es noch keine detaillierten Expressions-Untersuchungen von TRPV5 auf Proteinebene, sondern die meisten Hinweise beruhen auf RNA-Transkripten und die Funktionalität des Kanals ist meist im Überexpressionssystem untersucht worden. Zuerst wird eine kommerziell erhältliche Western Blot-Membran, auf der mehrere humane Gewebelysate (50 µg) aufgetragen sind, mit dem Antikörper 982/3 inkubiert (Abb. 18 A), der bei zuvor

gezeigten Western Blot-Analysen (Abb. 16) die spezifischsten Signale lieferte. Zusätzlich wird der Blot auch mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper der Firma Alomone inkubiert (Abb. 18 B).

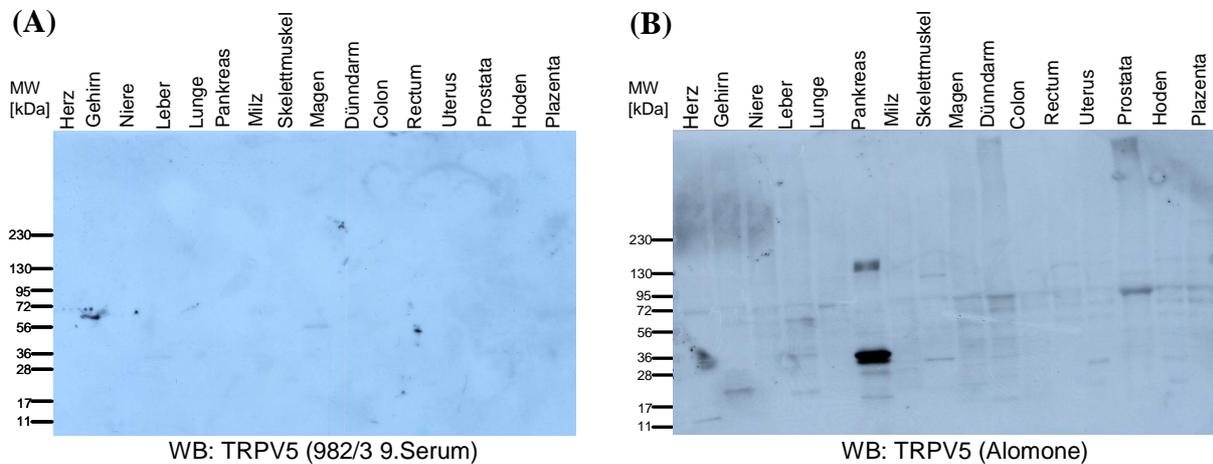


Abb. 18: Nachweis von TRPV5 in verschiedenen humanen Gewebelysaten.

Auf einem kommerziell erhältlichen Gewebelot (Firma BioChain) sind jeweils 50 µg Gesamtprotein aus verschiedene Gewebelysaten aufgetragen. (A) Inkubation des Blots mit Antikörper 982/3 9.Serum. (B) Inkubation des Blots mit dem Antikörper Alomone. Sekundärantikörper jeweils anti-rabbit-HRP 1:50000.

Es konnte mit keinem der beiden Antikörper ein TRPV5 spezifisches Signal detektiert werden, welches dem theoretischen Molekulargewicht von TRPV5 (ca. 83 kDa) entspricht. Mit dem Antikörper 982/3 wurde lediglich eine Proteinande bei etwa 60 kDa im Gehirnllysate detektiert (Abb. 18 A). Der Antikörper der Firma Alomone erkennt zwar in allen Spuren Proteine, die zum Teil bei gleichen Molekulargewichten auftreten, aber von der Größe alle nicht dem TRPV5-Ionenkanal zugeordnet werden können und somit aller Wahrscheinlichkeit nach unspezifisch sind. Auf dem Western Blot ist auch ein Gewebelysate der Niere und der Plazenta aufgetragen, allerdings konnte das TRPV5 Protein bei beiden nicht detektiert werden. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass in diesem Blot nur Zelllysate der Geweben aufgetragen sind, die sowohl zytosolische als auch membranäre Bestandteile der Zellen enthalten. Daher werden im Folgenden Membran-angereicherte Fraktionen aus verschiedenen Rattengeweben hergestellt und die Expression des membranständigen TRPV5 Proteins im Western Blot analysiert (Abb. 19).

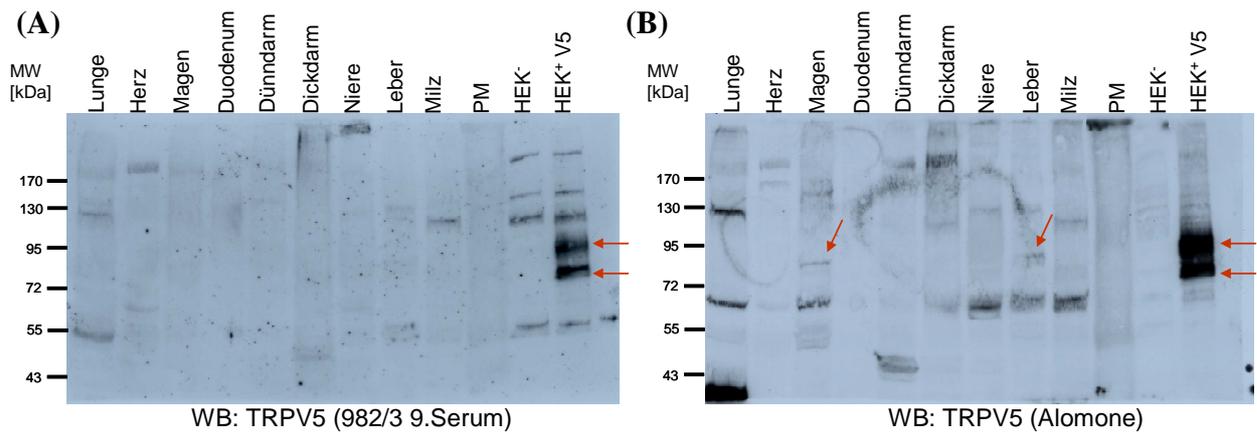


Abb. 19: Nachweis von TRPV5 in verschiedenen Rattengewebemikrosomen.

Aus verschiedenen Geweben, die einer P20 Ratte entnommen wurden, wurden Mikrosomen hergestellt und jeweils 400 µg Gesamtprotein auf ein SDS Gradientengel aufgetragen mit anschließendem Western Blot. (A) Inkubation des Blots mit Antikörper 982/3 3.Serum. (B) Inkubation des Blots mit dem Antikörper Alomone. Sekundärantikörper jeweils anti-rabbit-HRP 1:50000.

Ähnlich wie bei dem Gewebeblot mit den humanen Lysaten konnte auch in den mikrosomalen Rattengeweben das TRPV5 Protein mit dem Antikörper 982/3 nicht nachgewiesen werden. Zur Kontrolle sind neben den Rattenmikrosomen auch TRPV5-transfizierte HEK-Zellen aufgetragen. Diese detektierten Proteine befinden sich beim erwarteten Molekulargewicht für TRPV5, allerdings konnte in keinem der Rattengewebe auf der gleichen Höhe im Western Blot Signale detektiert werden, auch nicht in Rattennieren. Ähnlich werden mit dem Antikörper der Firma Alomone in der Spur mit den transfizierten HEK-Zellen deutliche Signale für TRPV5 detektiert und auf der gleichen Höhe, aber wesentlich schwächer, Signale für Leber- und Magenmikrosomen. Aber in der Spur mit den Nierenmikrosomen werden auch hier keine spezifischen Signale detektiert. Da mit den entsprechenden Antikörpern in keinem der untersuchten Gewebe deutliche Menge des TRPV5 Proteins nachgewiesen werden, auch nicht in der Niere, werden in folgenden Versuchen die anderen TRPV5 Antikörper 1052, 1074 und 1075 sowie zum Vergleich Antikörper 982/3 mit humanem Plazentagewebe weiter ausgetestet.

4.2.6 Validierung der vier TRPV5 Antikörper mittels Western Blot Analyse

Wie für den Antikörper 982/3 in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, werden auch die anderen Antikörper auf ihre TRPV5-Spezifität im Western Blot getestet. Hierzu werden die Seren über das immobilisierte Peptid affinitätsgereinigt (3.4.5) und die polyklonalen Antikörper mit Hilfe der GST-TRPV5 Fusionsproteine und mit humanen Plazentamikrosomen auf ihre Spezifität

getestet. Der Antikörper mit einem N-terminalen Epitop innerhalb der TRPV5-Sequenz, 1074, sollte das Fusionsprotein N7 erkennen welches den gesamten N-Terminus repräsentiert (N7) und keine C-terminalen Fusionsproteine. Umgekehrt dürften die anderen drei Antikörper (982, 1052 und 1075) nicht N1 detektieren, welches einen Teil des N-Terminus repräsentiert. Für die Western Blots zum Nachweis der C-terminalen Antikörper werden die beiden Fusionsproteine C3 und C3 verwendet. Die Lage der Antikörper-Epitope auf den Fusionsproteinen ist bereits in Abb. 9 dargestellt sowie die Expression der verwendeten Fusionsproteine im Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 13 A). Als Expressionskontrolle werden zuvor die Western Blots mit einem GST-spezifischen Antikörper analysiert und gezeigt, dass in jeder Spur GST-haltige Fusionsproteine bzw. GST entsprechend dem erwarteten Molekulargewicht (MW) vorhanden sind (Abb. 20). Diese Membranen werden gestrippt (3.3.11.3) und anschließend mit affinitätsgereinigten Antikörpern inkubiert. Für jeden Peptid-Antikörper ist exemplarisch nur ein Serum sowohl auf den Fusionsproteinen als auch auf Plazentamikrosomen gezeigt (Abb. 21) und die anderen Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

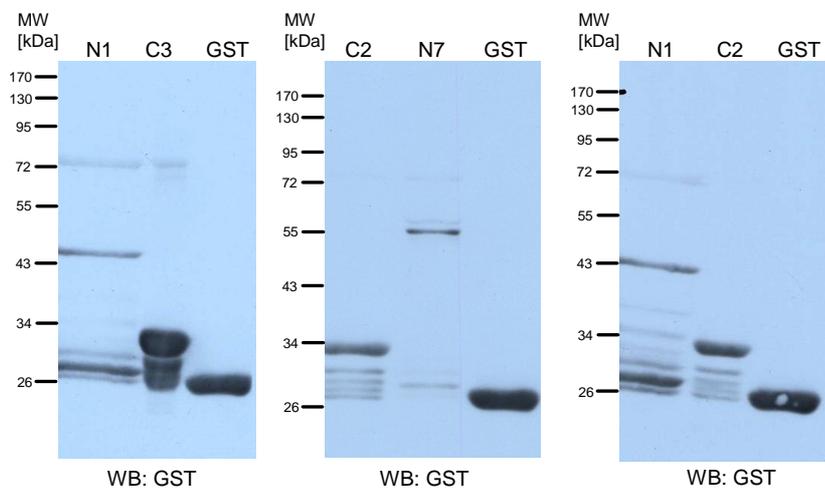


Abb. 20: Nachweis der TRPV5 Fusionsproteine und GST im Western Blot zur Expressionskontrolle
10% SDS Gele auf denen die Fusionsproteine N1, N7, C2, C3 sowie GST aufgetragen sind (je 2 μg). Die Blots wurden alle mit dem GST-Antikörper inkubiert, zum Nachweis, dass in allen Spuren Proteine vorhanden sind. Sekundärantikörper: anti-rabbit-HRP 1:50000

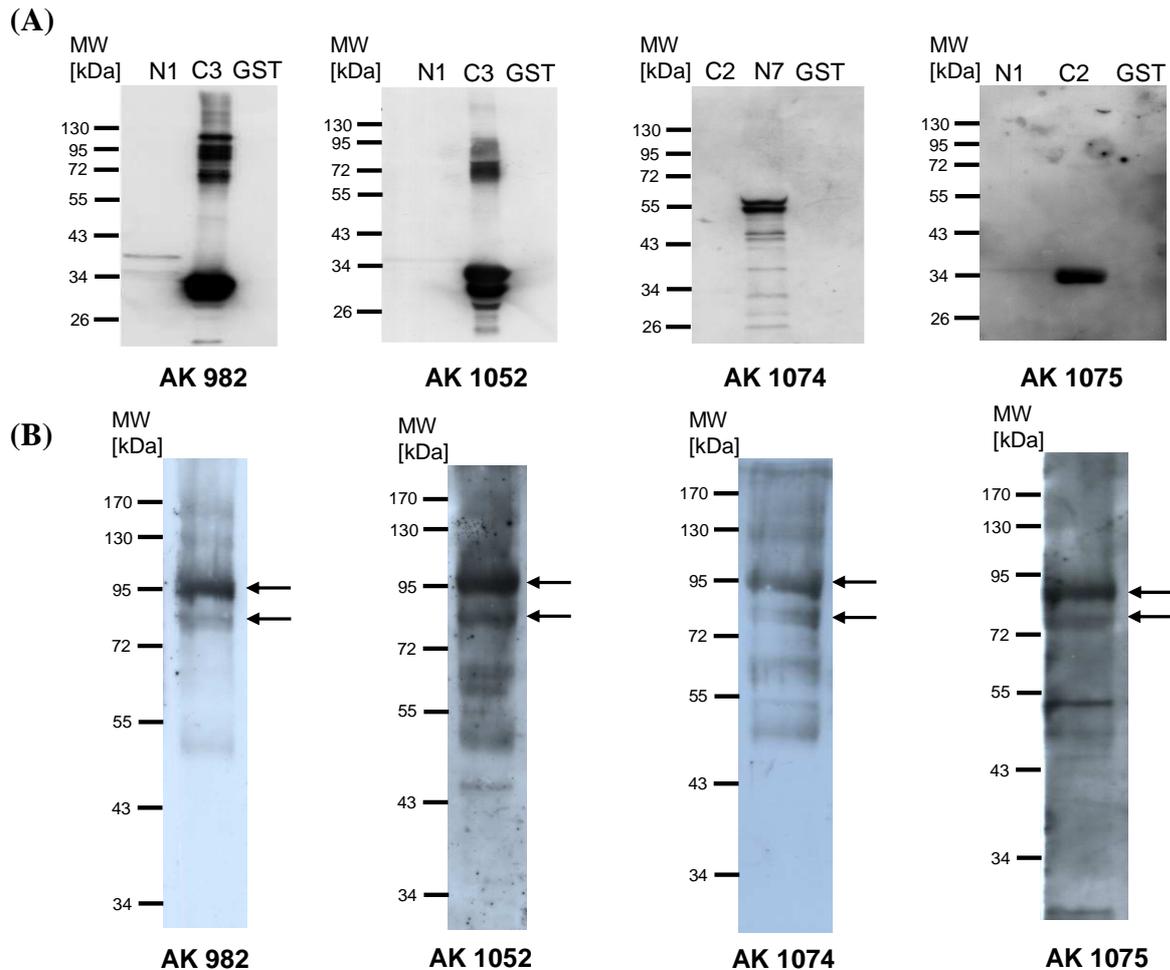


Abb. 21: Western Blots mit vier TRPV5 Antikörpern auf Fusionsproteinen und Plazentamikrosomen. (A) Western Blots mit den TRPV5 Antikörpern 982/3 (9.Serum), 1052 (3.Serum), 1074 (4.Serum) und 1075 (5.Serum) zur Detektion der TRPV5 Fusionsproteine auf den gleichen Membranen, die in Abb. 20 gezeigt sind. Konzentration Primärantikörper: je 15 µg/ml. Sekundärantikörper anti-rabbit-HRP 1:50000. (B) Western Blots mit den gleichen Seren wie in (A) zur Detektion des TRPV5 Proteins in Plazentamikrosomen (jeweils 200 µg). Sekundärantikörper anti-rabbit-HRP 1:33000. Pfeile: TRPV5 Protein in glykosylierter und nicht glykosylierter Form.

Beim Spezifitätstest mit den Fusionsproteinen erkennen die Antikörper 982/3, 1052 und 1075 nur das entsprechende C-terminale Protein und nicht das N-terminale Fusionsprotein oder GST. Unterhalb der erwarteten Antikörpersignale sind teilweise Abbauprodukte des Fusionsproteins zu erkennen (Abb. 21 A). Bei dem C3-Protein (AK 982/3 + 1052) erkennen die Antikörper zusätzlich noch Proteine im Bereich von 60-100 kDa, die nicht mit der theoretischen Größe für C3 korrelieren. Das schwache Signal, das in der Spur von N1 zwischen 34 und 43 kDa von den drei Antikörpern 982/3, 1052 und 1075 erkannt wird, entspricht nicht dem monomeren GST-Fusionsprotein, da dieses ca. bei 43-45 kDa im SDS-Gel läuft (vgl. Abb. 20), sondern ist auf die Detektion eines unbekanntes bakteriellen Proteins zurückzuführen, das unspezifisch erkannt wird. Bei dem Antikörper 1074, der gegen ein N-terminales Peptid gerichtet ist, tritt nur ein Signal in der Spur mit dem Fusionsprotein N7 auf,

aber nicht bei GST oder C2. Im den Western Blot Analysen mit den Plazentamikrosomen detektieren alle Seren Proteine mit einem Molekulargewicht von 72 kDa und 95 kDa (Abb. 21 B). Diese Signale sind wesentlich stärker als mehrere andere unspezifische Hintergrundsignale, die zusätzlich auftreten. Da TRPV5 unter anderem glykosyliert vorliegen kann (siehe Einleitung), könnte die untere der beiden spezifischen Banden die nicht glykosylierte und die obere die glykosylierte Form des Proteins repräsentieren. Um dies eindeutig zu belegen, ist ein Deglykosylierungsversuch (Abschnitt 4.3.4) notwendig. Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle untersuchten Antikörperseren sowohl das korrekte Fusionsprotein erkennen als auch zwei Proteinbanden in den Plazentamikrosomen (MW ~80 kDa und 95 kDa) und somit im Western Blot das TRPV5 Protein aus humaner Plazenta spezifisch detektieren. Die nicht gezeigten Ergebnisse der Antikörperseren sind in Tabelle 17 dargestellt. Die Affinität der Antikörper für TRPV5 ist unterschiedlich hoch, was sich auch in der Intensität der Western Blot-Signale widerspiegelt. Manche Seren produzieren einen starken Hintergrund, wie zum Beispiel das gezeigte 4.Serum von Antikörper 1075 im Vergleich zum 9.Serum von Antikörper 982/3 (Abb. 21). Die affinitätsgereinigte Antikörpermenge variiert zwischen ca. 1,2 mg und 5 mg Ausbeute pro 5 ml aufgereinigtem Serum (Tabelle 17).

Tabelle 17: Affinitätsgereinigte TRPV5 Antikörper .

Die über eine entsprechende Peptidsäule affinitätsgereinigten Antikörper wurden bezüglich ihrer Spezifität im Western Blot beurteilt. Seren, die kursiv markiert wurden, sind in Abb. 21 dargestellt.

Peptid	Serum	affinitätsgereinigte AK-Menge (pro 5 ml Serum)	Signal/Hintergrund- Verhältnis im WB
982	7. Serum	3,2 mg	++
982	<i>9. Serum</i>	2,2 mg	+++
982	10. Serum	3,88 mg	+
982	Endserum	1,19 mg	+
1052	2. Serum	3,65 mg	+++
1052	3. Serum	4,87 mg	++
1052	5. Serum	4,13 mg	+++
1052	<i>6. Serum</i>	2,23 mg	+++
1074	3. Serum	1,97 mg	++
1074	<i>5. Serum</i>	1,31 mg	+
1075	<i>4. Serum</i>	2,8 mg	++
1075	Endserum	2,1 mg	++

4.2.7 Antikörper-Validierung mittels Immunhistochemie

Diejenigen TRPV5-Antikörper, die im Western Blot ausgetestet wurden und in Plazentamikrosomen positive Signale lieferten, werden weiterhin mit Hilfe immunhistochemischer Methoden validiert. Hierbei wird die Lokalisation von TRPV5 in der Maus-Niere und der humanen Plazenta genauer untersucht.

Zur Detektion werden sowohl ein Primär- und ein Sekundärantikörper eingesetzt. Um auszuschließen, dass der zweite Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, der normalerweise gegen den F_c-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, unspezifisch an Proteine im Gewebe bindet und dadurch falsch positive Signale liefert, werden bei jeder Versuchreihe mindestens zwei Schnitte nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Da für alle gezeigten Bilder die TRPV5-Antikörper (aus Kaninchen) immer in grüner Fluoreszenz dargestellt sind und die jeweiligen Kofluoreszenzen (Maus-Antikörper) immer in rot, sind im Folgenden exemplarisch für alle Versuche die Zweitantikörperkontrolle für Alexa488 anti-Kaninchen und Alexa594 anti-Maus gezeigt (Abb. 22). In beiden gezeigten Fällen und auch bei allen anderen Versuchen, wird durch die verwendeten Zweitantikörper keine unspezifische Hintergrundfärbung detektiert.

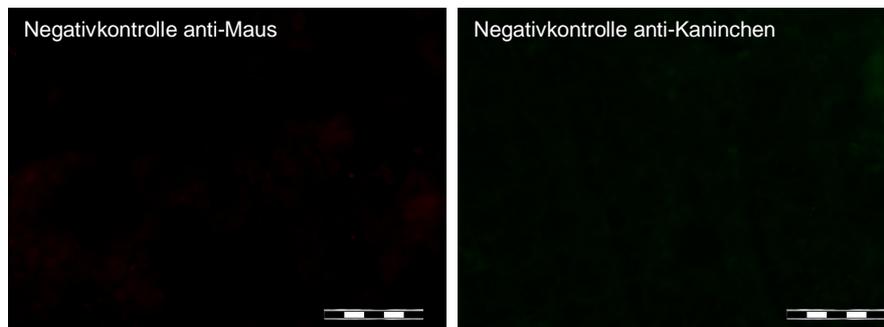


Abb. 22: Negativkontrolle für Immunhistologie.

10 µm dicke Kryoschnitte von Plazentagewebe wurden nach Fixieren und Blocken nur mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in H₂O_{ddest.}) inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Für den Antikörper anti-Maus ist die Negativkontrolle mit Alexa594 gezeigt und für anti-Kaninchen mit Alexa 488. Maßstab balken 100 µm.

In der Niere ist das TRPV5 Protein am stärksten exprimiert und außerdem seine subzelluläre Lokalisation eingehend untersucht [Hoenderop et al., 2000; Loffing et al., 2001]. Die Versuche mit Nierengewebe wurden in Kooperation mit der AG Bleich, Universität Kiel von Frau Dr. Nina Himmerkus durchgeführt. In dem in Abb. 23 dargestellten Nephron, ist der

Bereich in dem TRPV5-Proteine exprimiert werden (letzter Teil des distalen Konvoluts) blau markiert. Die beiden Bilder der oberen Reihe sind identisch, in dem linken wurde die Farbintensität nachträglich erhöht, um die einzelnen Strukturen der Niere besser unterscheiden zu können.

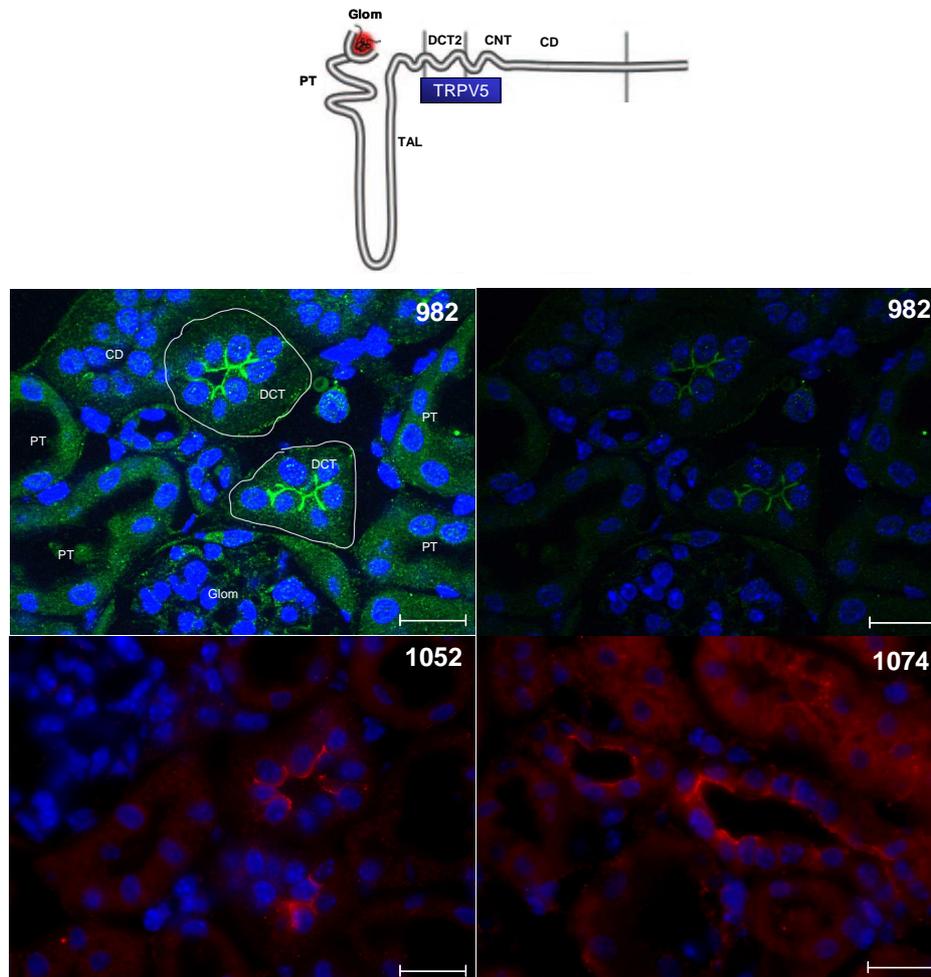


Abb. 23: TRPV5 Antikörper auf Kryoschnitten vom Maus-Nieren

5 µm dicke Kryoschnitte von Plazentagewebe werden nach Fixieren und Blocken mit den drei verschiedenen TRPV5 Antikörpern 982, 1052 und 1074 inkubiert. Der Nachweis erfolgt mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern: anti-rabbit Alexa 488 für 982; anti-rabbit Alexa594 für 1052 und 1074. Zellkerne sind blau angefärbt (DAPI). Maßstabballen: 20 µm. Präparation der Nieren, Anfertigung der Schnitte sowie die Detektion mit den Antikörpern wurde von Dr. Nina Himmerkus, Universität Kiel durchgeführt. Das Bild des Nephrons wurde verändert nach [Hoenderop et al., 2005].

Aufgrund der Morphologie kann in dem Schnitt unterschieden werden zwischen Glomerulus (Glom), dem proximalen Tubulus (PT), dem distalen Konvolut (DCT) und dem Sammelrohr (CD). In der oberen Reihe rechts ist das Original-Bild dargestellt, das mit dem Primärantikörper 982 inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem grünen Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht wurden. Im Vergleich zu dem ersten Bild ist deutlich zu sehen, dass vor allem die luminalen Seite und damit die

Apikalmembran des distalen Konvoluts angefärbt ist; die Zellkerne sind blau gefärbt. Im Vergleich mit den anderen TRPV5-Antikörpern werden mit dem Antikörper 982 die spezifischsten Ergebnisse erzielt. Mit dem Antikörper 1052 (Abb. 23 unten links; rot) können ebenfalls die gleichen Strukturen im DCT wie mit dem Antikörper 982 angefärbt werden. Bei Inkubation mit dem Antikörper 1074 werden zwar auch Bereiche im DCT stark angefärbt, aber gleichzeitig werden auch andere Strukturen unspezifisch detektiert. Mit dem Antikörper 1075 (Ergebnisse nicht gezeigt) wird keine spezifische TRPV5 Lokalisierung in der Niere nachgewiesen.

Aufgrund des spezifischen TRPV5 Nachweises in dem Maus-Nierengewebe werden die TRPV5 Peptid-Antikörper nun auch für eine Immunfärbung der humanen Plazenta eingesetzt. Um die subzelluläre Lokalisation der TRPV5-Proteine zu bestimmen, werden in der Regel Doppelfärbungen von TRPV5 und einem Markerprotein durchgeführt. Als Marker dient entweder Cytokeratin 7 (CK7), das ein Zytoskelettprotein in Trophoblasten ist und somit den Synzytiotrophoblasten (STB) anfärbt [Maldonado-Estrada et al., 2004] oder die placentare Alkalische Phosphatase (AP), die in der Apikalmembran des Synzytiotrophoblasten lokalisiert ist [McLaughlin et al., 1983]. Die Zellkerne werden mit Propidiumjodid angefärbt, welches ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (rot) ist.

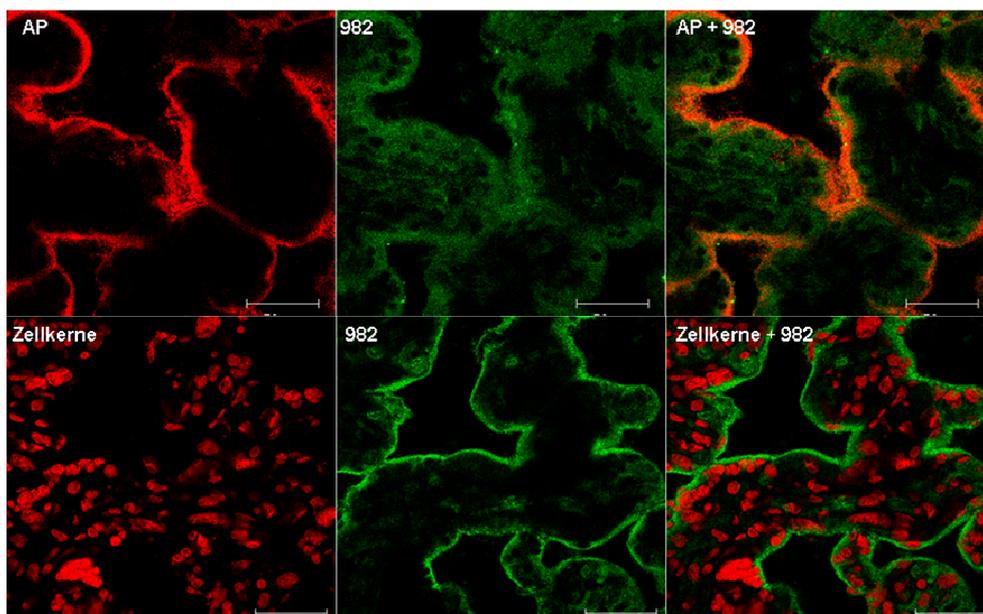


Abb. 24: Immunhistochemie mit Antikörper 982/3 auf humanen Plazentaschnitten.

Obere Reihe: 20 μm dicke Kryoschnitte von humaner Plazenta werden nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Blockieren mit Carageen mit dem Antikörper 982 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und einem Antikörper gegen die Alkalische Phosphatase (AP; 1:1000) inkubiert, gewaschen und mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (anti-Maus Alexa 594 und anti-rabbit Alexa488). Untere Reihe: Schnitte werden wie oben vorbereitet, aber anstatt mit Alkalischer Phosphatase werden im Schnitt die Zellkerne mit Propidiumjodid angefärbt. Die Aufnahmen erfolgen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops. Maßstab: 50 μm

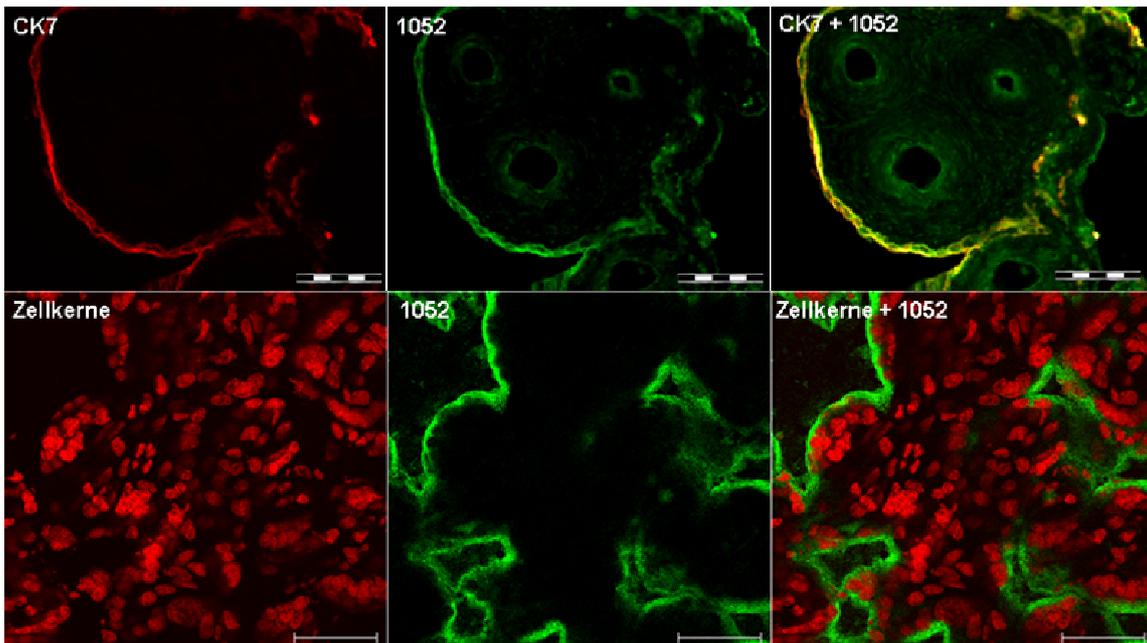


Abb. 25: Immunhistochemie mit Antikörper 1052 auf humanen Plazentaschnitten.

Obere Reihe: 10 µm dicke Kryoschnitte von humaner Plazenta werden nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Blockieren mit Carageen mit dem Antikörper 1052 (100 µg/ml) und einem Antikörper gegen Cytokeratin7 (CK7) inkubiert, gewaschen und mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (anti-Maus Alexa 594 und anti-rabbit Alexa488). Die Aufnahmen erfolgen im Fluoreszenzmikroskop. Maßstab: 100 µm. Untere Reihe: Schnitte werden wie oben vorbereitet, aber anstatt mit Cytokeratin7 werden im Schnitt die Zellkerne mit Propidiumjodid angefärbt. Die Aufnahmen erfolgen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops. Maßstab: 50 µm

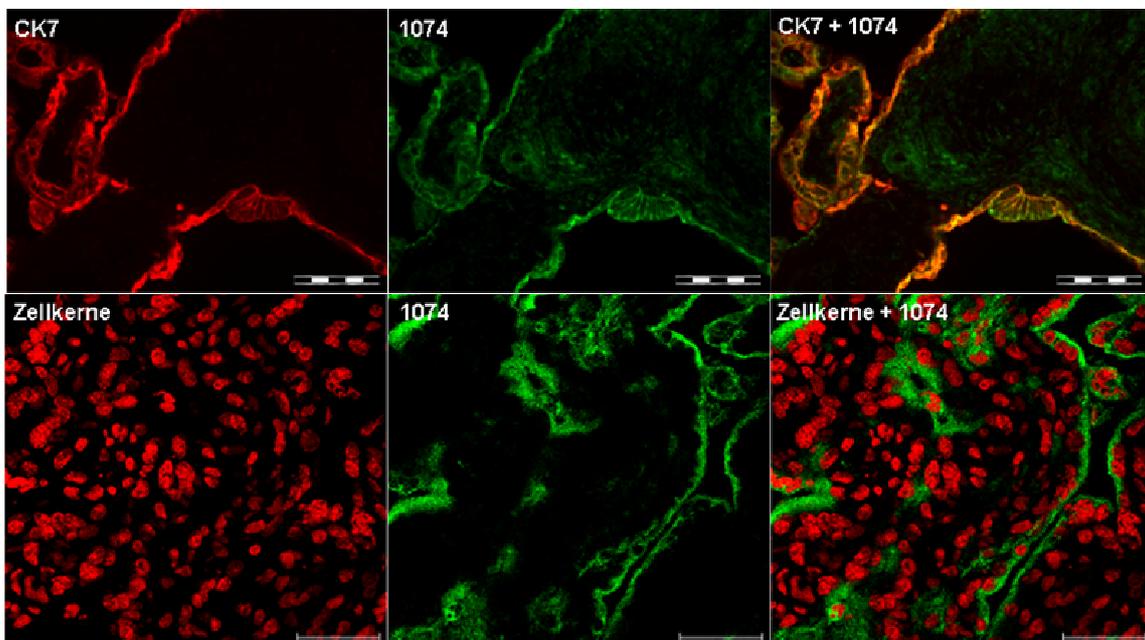


Abb. 26: Immunhistochemie mit Antikörper 1074 auf humanen Plazentaschnitten.

Obere Reihe: 10 µm dicke Kryoschnitte von humaner Plazenta werden nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Blockieren mit Carageen mit dem Antikörper 1074 (100 µg/ml) und einem Antikörper gegen Cytokeratin7 (CK7) inkubiert, gewaschen und mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (anti-Maus Alexa 594 und anti-rabbit Alexa488). Die Aufnahmen erfolgen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Maßstab: 200 µm. Untere Reihe: Schnitte werden behandelt wie oben, aber anstatt mit Cytokeratin7 werden im Schnitt die Zellkerne mit Propidiumjodid angefärbt. Die Aufnahmen erfolgen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops. Maßstab: 50 µm

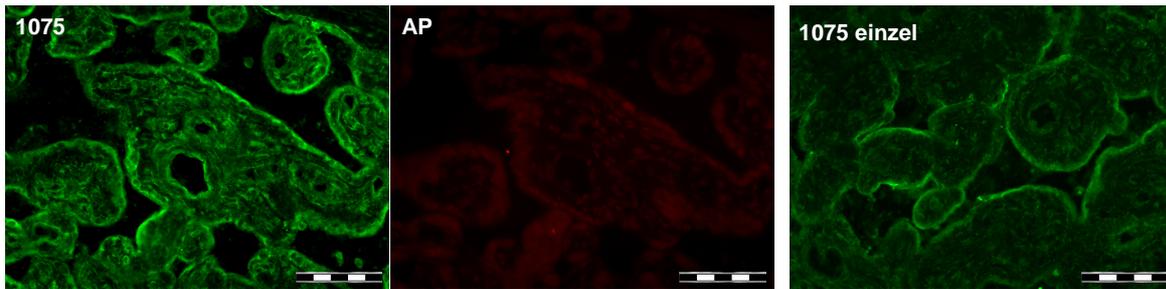


Abb. 27: Immunhistochemie mit Antikörper 1075 auf humanen Plazentaschnitten.

10 µm dicke Kryoschnitte von humaner Plazenta werden nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Blockieren mit Carageen mit dem Antikörper 1075 (100 µg/ml) und einem Antikörper gegen die Alkalische Phosphatase inkubiert, gewaschen und mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (anti-Maus Alexa 594 und anti-rabbit Alexa488). Im letzten Bild wurde nur mit 1075 als Primärantikörper inkubiert. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Maßstab: 100 µm.

Das TRPV5 Protein wird mit allen vier TRPV5-Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität im Plazentagewebe nachgewiesen. Die Immunfärbung von TRPV5 mit Antikörper 982 (grün) ist als Doppelfluoreszenz mit dem Markerprotein Alkalische Phosphatase (rot) gezeigt (Abb. 24, obere Reihe), das in der apikalen Membran des STB lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu werden mit dem TRPV5 Antikörper auch intrazelluläre Bereiche der Chorionzotten angefärbt und die Färbung ist insgesamt weniger distinkt im Vergleich zur AP. Bei Überlagerung der beiden Fluoreszenzen für TRPV5 und AP ist eine Kolokalisation der beiden Proteine nicht eindeutig nachzuweisen, obwohl für TRPV5 eine Lokalisation in der Apikalmembran der STB erwartet wird. Eine stärkere Lokalisation von TRPV5 im Bereich des Synzytiotrophoblasten und eine insgesamt distinktere Färbung wird dann detektiert, wenn keine Antikörper-Inkubation gegen eines der beiden Markerproteine erfolgt, sondern die Zellkerne parallel mit Propidiumjodid angefärbt werden (Abb. 24 untere Reihe). Eine wesentlich deutlichere Kolokalisation mit CK7 (im STB) zeigt der Antikörper 1052 (Abb. 25, obere Reihe). Die angefärbten Bereiche sind größtenteils identisch. Zusätzlich werden mit dem TRPV5 Antikörper drei kreisförmige Strukturen im Innern der Chorionzotten angefärbt, welche die Wände von fetalen Blutgefäßen darstellen. Eine ähnliche Färbung des STB kann auch bei gleichzeitiger Färbung von TRPV5 und den Zellkernen beobachtet werden (Abb. 25, untere Reihe). Betrachtet man die Lokalisation der Immunfärbung des Antikörpers 1074 (Abb. 26) so werden ähnliche Bereiche detektiert, wie mit dem Antikörper 982; zum Teil ist die Färbung im Synzytiotrophoblasten vorhanden, aber auch interne Bereiche zeigen eine Fluoreszenz, die teilweise diffus wirkt. Die intrazelluläre Färbung tritt sowohl bei Doppelfärbung mit CK7 (Abb. 26, obere Reihe), als auch bei den Zellkernen auf (Abb. 26, untere Reihe). Am wenigsten spezifisch erweist sich der Antikörper 1075 für die Immunfluoreszenz (Abb. 27). Nur in wenigen Schnitten konnte eine eindeutige Färbung

beobachtet werden wobei eine gleichzeitige Antikörper-Doppelfärbung gegen eines der beiden Markerproteine nicht möglich ist. Auf dem linken Bild wurde der Schnitt mit dem TRPV5-Antikörper 1075 und der AP koinkubiert, wobei zwar eine Färbung im Bereich des STB auftritt, aber auch andere Zellstrukturen angefärbt werden. Für die beiden Markerproteine (AP: mittleres Bild, CK7: nicht gezeigt) können nur extrem schwache Fluoreszenzsignale mit einer starken Hintergrundfärbung detektiert werden, eine parallele TRPV5 und Zellkernfärbung war nicht möglich. Wurde der Schnitt jedoch nur mit dem TRPV5 Antikörper inkubiert, kann zum Teil eine spezifische Färbung im Bereich des Synzytiotrophoblasten detektiert werden. Auch hier treten Signale im Innern der Chorionzotten auf (Abb. 27, Bild rechts).

Mit dem Einsatz der vier TRPV5 Antikörper für die Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass sich der Antikörper 1052 für eine Immunfluoreszenzfärbung am besten eignet, da er sowohl in den Schnitten von Maus-Nieren und vor allem in der humanen Plazenta eine spezifische TRPV5 Lokalisation nachweist. Der Antikörper 982 ist zwar für die Immunfärbung im Mausnieren-Gewebe gut geeignet, allerdings ist die Spezifität auf Plazentagewebe nicht so hoch. Der Antikörper 1075 detektiert TRPV5 im Maus-Nierengewebe nicht und zeigt auch in Plazentagewebe eine größtenteils unspezifische Bindung.

4.3 Immunpräzipitationen zur Anreicherung von TRPV5 aus humaner Plazenta

4.3.1 Immunpräzipitationen mit RIPA als Solubilisierungspuffer

Für die Immunpräzipitation (IP) werden neben der Plazenta weitere Gewebe aus verschiedenen Spezies verwendet, in denen TRPV5 am stärksten exprimiert ist (Niere und Pankreas, siehe Einleitung). Da TRPV5 ein Membranprotein ist, wird es vor der IP mit Detergenzien solubilisiert. Hierzu wird RIPA-Puffer verwendet, weil er zu den stringentesten Extraktionspuffern zählt, der mehrere Detergenzien (Nonidet P-40, SDS, Natrium-deoxycholat) enthält, die zur Gruppe der nicht ionischen und ionischen Seifen zählen. Das mit RIPA-Puffer aus Plazentamikrosomen erhaltene Solubilisat wird anschließend mit Antikörper-gekoppelter Protein A-Agarose inkubiert und die präzipitierten Proteine nach Elution von der Säule im Western Blot analysiert. Die verschiedenen Versuchsansätze, die mit RIPA-Puffer durchgeführt wurden, sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Immunpräzipitationen mit RIPA-Puffer. In der Tabelle sind alle IP-Ansätze aufgelistet, die mit RIPA-Puffer aus verschiedenen Geweben und Spezies mit TRPV5 Antikörpern durchgeführt wurden.

Gewebe	Proteinmenge pro IP	Antikörper für IP (eingesetzte Menge pro IP)	Puffer
humane Plazentamikrosomen	10 mg	982/3 5.Serum (gereinigt) 3 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	982/3 5.Serum 50 µl	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	982/3 9.Serum (gereinigt) 5 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	982/3 9Serum 50 µl	RIPA
humane Plazentamikrosomen	25 mg	982/3 9.Serum (gereinigt) 10 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	25 mg	982/3 9.Serum 50 µl	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	1052 5.Serum 50 µl	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	1052 6.Serum 100 µl	RIPA
humane Plazentamikrosomen	25 mg	1074 5.Serum (gereinigt) 20 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	25 mg	1074 5. Serum 50 µl	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	H99 3 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	30 mg	H99 3 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	CAT-2 3 µg	RIPA
humane Plazentamikrosomen	10 mg	Alomone 3 µg	RIPA
bovine Nierenmikrosomen	10 mg	982/3 5.Serum (gereinigt) 2,5 µg	RIPA
bovine Nierenmikrosomen	10 mg	982/3 5.Serum 50 µl	RIPA
bovine Nierenmikrosomen	30 mg	982/3 9.Serum 25 µl	RIPA
bovine Nierenmikrosomen	10 mg	1052 5.Serum 50 µl	RIPA
bovine Nierenmikrosomen	10 mg	1052 6.Serum 100 µl	RIPA
bovine Nierenmikrosomen	10 mg	Alomone 3 µg	RIPA
bovine Pankreasmikrosomen	20 mg	982/3 9.Serum 50 µl	RIPA
bovine Pankreasmikrosomen	30 mg	982/3 9.Serum 25 µl	RIPA
bovine Pankreasmikrosomen	10 mg	1052 6.Serum 100 µl	RIPA
bovine Pankreasmikrosomen	20 mg	1052 6.Serum 50 µl	RIPA
bovine Pankreasmikrosomen	10 mg	Alomone 3 µg	RIPA
Kaninchen Nierenmikrosomen	10 mg	982/3 5.Serum (gereinigt) 2,5 µg	RIPA
Kaninchen Nierenmikrosomen	10 mg	982/3 5.Serum 50 µl	RIPA

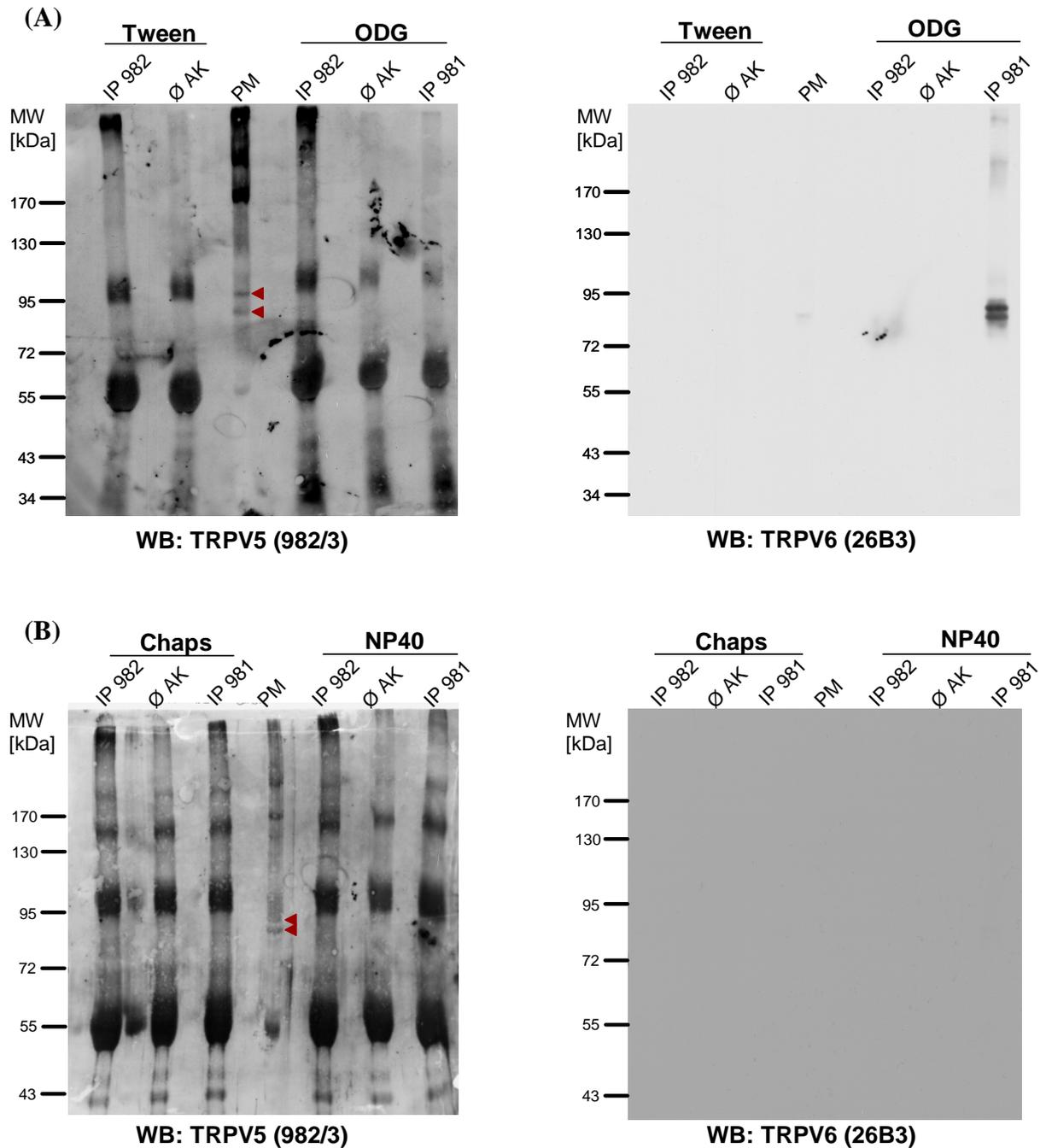
Kaninchen Nierenmikrosomen	10 mg	1052 5.Serum 50 µl	RIPA
Kaninchen Nierenmikrosomen	10 mg	1052 6.Serum 100 µl	RIPA
Kaninchen Nierenmikrosomen	10 mg	Alomone 3 µg	RIPA
Ratten Nierenmikrosomen	8,5 mg	982/3 5.Serum (gereinigt) 2,5 µg	RIPA
Ratten Nierenmikrosomen	8,5 mg	982/3 5.Serum 50 µl	RIPA

Allerdings konnte in keinem der IP-Ansätze im anschließenden Western Blot das TRPV5 Protein nachgewiesen werden. Auch bei den Immunpräzipitationen aus den anderen Geweben, die mit den verschiedenen TRPV5 Antikörper durchgeführt wurden, kann TRPV5 nicht immunpräzipitiert werden. Insgesamt legt dies die Vermutung nahe, dass das TRPV5 Protein mit den im RIPA Puffer enthaltenen Detergenzien nicht ausreichend aus der Membran gelöst werden kann oder die Antikörper-Antigen Wechselwirkung beeinträchtigt ist. Welches Detergenz am besten zu Solubilisierung eines bestimmten Proteins geeignet ist, kann nicht vorhergesagt werden, sondern muss empirisch ermittelt werden. Aber auch Versuche mit dem Detergenz Natriumdeoxychololat (Abb. nicht gezeigt), welches für das nah verwandte Protein TRPV6 gut geeignet ist, führen nicht zu einer erfolgreichen Immunpräzipitation. Deshalb werden in den folgenden Versuchen andere Detergenzien ausgetestet.

4.3.2 Austesten verschiedener Detergenzien für die Immunpräzipitation von TRPV5

Da wie im vorherigen Abschnitt beschrieben TRPV5 mit RIPA-Puffer nicht erfolgreich präzipitiert werden konnte wurden sowohl weitere nichtionische als auch eines mit zwitterionischer Eigenschaft zur Solubilisierung eingesetzt. Hierzu wird das Detergenz immer im Solubilisierungspuffer gelöst, in einer Konzentration, die mindestens oberhalb der kritisch mizellaren Konzentration (CMC) liegt und zusätzlich wird auf das Seifen-Proteinverhältnis geachtet (Tabelle 9). Die verwendeten Mikrosomen (20 mg pro IP) stammen jeweils aus der Plazenta und für die Immunpräzipitation wurde immer das affinitätsgereinigte 9. Serum von Antikörper 982/3 verwendet. Parallel zu jeder Immunpräzipitation wurde ein IP-Ansatz mit dem TRPV6-Antikörper 981 durchgeführt, von dem bekannt ist, dass er für die Immunpräzipitation von TRPV6 aus Plazentamikrosomen geeignet ist. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass eine IP aus methodischen Gründen nicht funktioniert hat. Zur Detektion der möglicherweise präzipitierten TRPV5 Proteine im anschließenden Western Blot wurde der gleiche Antikörper (982/3 9.Serum) wie für die IP eingesetzt, da kein weiterer

zuverlässiger Antikörper aus einer anderen Spezies zur Detektion von TRPV5 Proteinen zur Verfügung steht. Für den Nachweis des TRPV6-Ionenkanals in den Kontroll-IPs wurde der monoklonale Antikörper 26B3 aus der Maus eingesetzt, der mit den Antikörpern, die für die IP benutzt wurden, nicht kreuz-reagiert (Abb. 28).



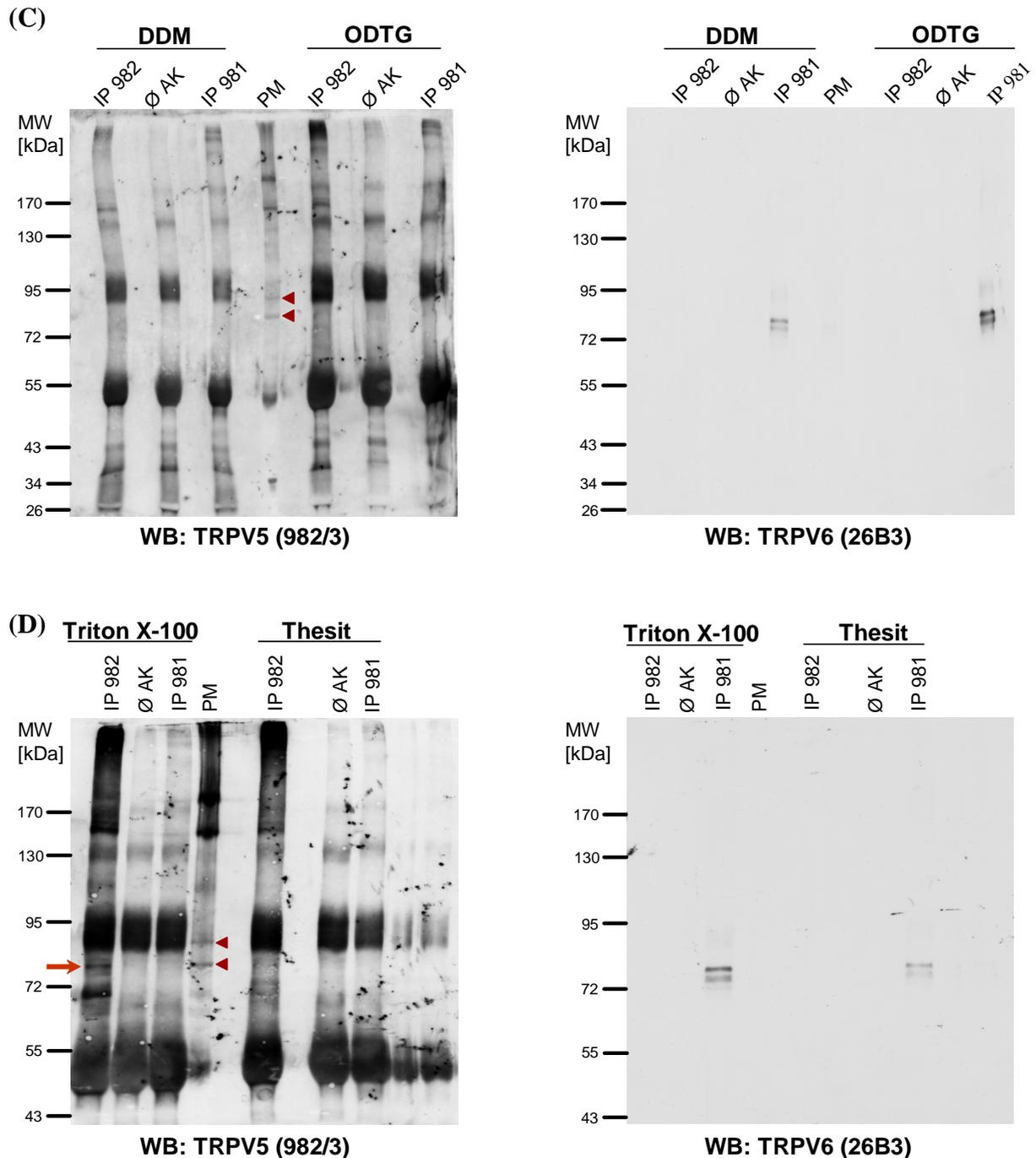


Abb. 28: Immunpräzipitation nach Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien.

Für die Solubilisierung von TRPV5 aus humanen Plazentamikrosomen wurden verschiedene Detergenzien eingesetzt und das Solubilisat im Anschluss für eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper 982/3 9.Serum (IP 982) sowie dem TRPV6 Antikörper 981 (IP 981) verwendet. Als Negativkontrolle wurde kein Antikörper an Protein A Sepharose gekoppelt (Ø AK). Die IP wurde im SDS-Gel (10%) mit anschließendem Western Blot analysiert. Zur Detektion im Western Blot wurde entweder der TRPV5 Antikörper 982/3 (jeweils links) oder der monoklonale TRPV6 Antikörper 26B3 (jeweils rechts) verwendet. (A) Solubilisierung mit den Detergenzien Tween-20 und Octyl- β -D-glucosid (ODG). (B) Solubilisierung mit CHAPS und Nonidet P40 (NP40). (C) Solubilisierung mit Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und Octyl- β -D-thioglucoisid (ODTG). (D) Solubilisierung mit Triton X-100 und Thesit. Pfeilspitzen: TRPV5 Protein in Plazentamikrosomen; Pfeil: TRPV5 Protein nach IP

Von den eingesetzten Detergenzien zur Solubilisierung von TRPV5 aus humanen Plazentamikrosomen, kann weder bei Tween-20 und Octyl- β -D-glucosid (Abb. 28 A), noch bei CHAPS und NP40 (Abb. 28 B) oder Dodecyl- β -D-maltosid und Octyl- β -D-thioglucosid (Abb. 28 C) das TRPV5 Protein im Western Blot detektiert werden. Zur Kontrolle sind jeweils die Mikrosomen in einer Spur im Western Blot mit aufgetragen, die für die IP eingesetzt wurden. In den entsprechenden Spuren sind immer, zum Teil aber recht schwach, zwei Banden bei dem Molekulargewicht zu erkennen, welches das TRPV5 Protein in der nicht glykosylierten und glykosylierten Form, also zwischen 80 und 100 kDa besitzt (Pfeilspitzen). Bei der IP, die an die Solubilisierung mit dem Detergenz Thesit angeschlossen wurde (Abb. 28 D), kann wie bei den anderen auch kein TRPV5 Protein detektiert werden. Mit dem Detergenz Triton X-100 wird das TRPV5 Protein anscheinend in ausreichenden Mengen aus der Membran gelöst und ist für die Antikörper zugänglich. Bei diesem Versuch wird bei einem gleichen Molekulargewicht wie in den Plazentamikrosomen auch eine Proteinbande im Präzipitat nachgewiesen, deren Signal verglichen mit den Mikrosomen sogar etwas stärker ist. In den Kontroll-IPs, die ohne Antikörper an der Protein A-Agarose durchgeführt wurden (\emptyset AK), ist bei keinem Detergenz eine Proteinbande mit dem entsprechenden Molekulargewicht des TRPV5 Proteins aufgetreten, auch nicht bei der IP mit Triton X-100. Zwei Banden, die in allen Blots und IP-Ansätzen, auch in der Negativkontrolle auftreten, sind einmal bei etwa 55 kDa und bei ca. 95 kDa und stammen von den eingesetzten Antikörpern, die an die Protein A-Agarose gebunden haben und beim Eluieren mit Probenpuffer mit von der Agarose gelöst wurden. Eine Inkubation der einzelnen Membranen mit dem TRPV6 Antikörper zeigt, dass die IP und der Western Blot prinzipiell funktioniert haben, da abgesehen vom Versuchsansatz, bei dem mit CHAPS bzw. NP-40 solubilisiert wurde in allen Ansätzen das TRPV6 Protein präzipitiert wurde. Des Weiteren zeigen diese Versuche, dass verschiedene Detergenzien unterschiedlich viel Protein aus der Membran solubilisieren, denn obwohl für jede IP die gleiche Ausgangsmenge an mikrosomalem Protein sowie gleiche Mengen an Antikörper eingesetzt wurden, ist die Menge des präzipitierten Proteins unterschiedlich. Zur Solubilisierung und IP für TRPV5 und TRPV6 erweist sich Triton X-100 als geeignetes Detergenz (Abb. 28 D). Bei der Zweitantikörper-kontrolle (nicht gezeigt) wird in keinem der Blots ein spezifisches TRPV5 oder TRPV6 Signal detektiert.

4.3.3 Immunpräzipitationen mit Triton X-100 als Detergenz zur Solubilisierung

In den bisher gezeigten Blots für die Immunpräzipitationen von TRPV5 aus der Plazenta werden durch die Antikörper im Versuchsansatz immer starke Hintergrundsignale bei 95 kDa und 55 kDa beobachtet, von denen vor allem die größere (bei 95 kDa) zum Teil die obere der beiden TRPV5 Proteinbanden überlagern könnte. Um diese Kreuzreaktionen durch die Antikörper zu vermindern, wird das Solubilisat, das endogene IgGs enthält, vor der IP mit ungekoppelter Protein-A-Sepharose vorinkubiert (Preclearing). Hierbei können Antikörper und andere Proteine aus dem Solubilisat, die später unspezifisch an die gekoppelte Protein A-Agarose binden würden, größtenteils entfernt werden. Gerade in Lysaten der Plazenta, die ein sehr blutreiches Gewebe darstellt, sind viele humane Antikörper enthalten. Zur weiteren Verbesserung der Signale werden die Ansätze für unterschiedliche Zeiten inkubiert, da durch eine zu lange Inkubation (IPs wurden normalerweise über Nacht inkubiert) die Möglichkeit besteht, dass die Proteine bereits degradiert werden. Das Ergebnis dieser Variation ist in Abb. 29 gezeigt.

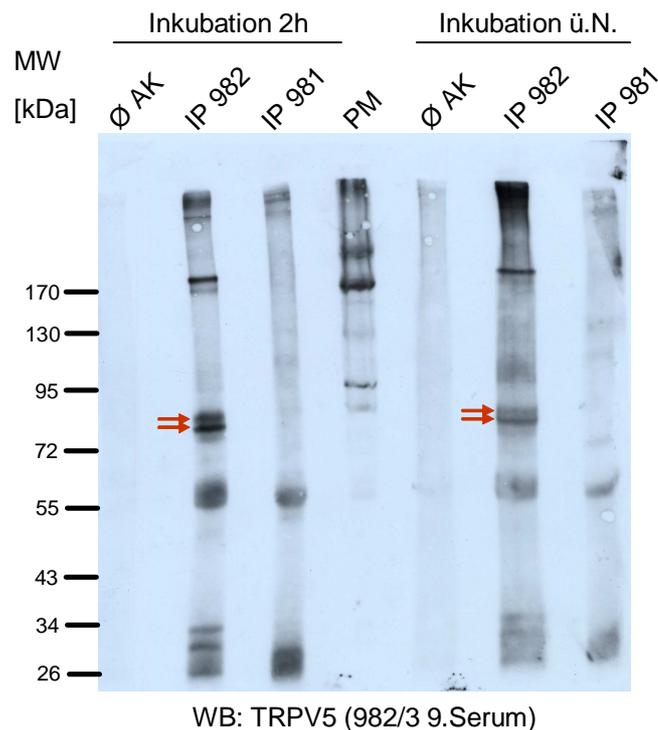


Abb. 29: Vergleich der Inkubationszeiten der IP für 2 Stunden und über Nacht.

Zur Solubilisierung von Plazentamikrosomen wurde Triton X-100 eingesetzt. Aus dem Solubilisat wurde TRPV5 mit dem Antikörper 982/3 9.Serum und TRPV6 mit dem Antikörper 981 präzipitiert und die Eluate in einer SDS-PAGE (10%) mit anschließendem Western Blot analysiert. Primärantikörper: 982/3 9.Serum; Sekundärantikörper anti-rabbit-LC HRP 1:30000.

Wie im Vergleich zwischen der Inkubation für zwei Stunden mit der Antikörper-gekoppelten Sepharose und einer Inkubation über Nacht zu sehen ist, sind bei einer kürzeren Inkubation die Banden wesentlich stärker und distinkter, aber beide Inkubationszeiten sind möglich. Durch die Isolierung endogener Gewebe-IgGs können die unspezifischen Banden bei 95 kDa deutlich reduziert werden, die bei 55 kDa treten zwar noch auf, sind aber im Vergleich zu den restlichen Banden wesentlich schwächer (vergleiche Abb. 28 + Abb. 29). In der Negativkontrolle (Abb. 29 IP Ø AK) konnten diese unspezifischen IgG-Banden dadurch komplett eliminiert werden. In den Plazentamikrosomen konnten nur ganz schwache Signale detektiert werden. Die Signale bei ca. 80 kDa, die TRPV5 zugeordnet werden, treten in den Immunpräzipitationen und auch in den Mikrosomen (Abb. 21) häufig, aber nicht immer als eine Doppelbande auf. Da TRPV5 als Glykoprotein beschrieben ist (siehe Einleitung), soll im Folgenden untersucht werden, ob die obere Bande die glykosylierte Form von TRPV5 darstellt.

4.3.4 Deglykosylierung von TRPV5

Um zu zeigen, dass die größere der Doppelbanden (MW ~95 kDa) im Western Blot das glykosylierte TRPV5 Protein darstellt, wird das Protein mit einer Glykosidase wie zum Beispiel der PNGase F deglykosyliert, wodurch diese Proteinbande verschwinden sollte. Da die Menge des TRPV5 Proteins in der Mikrosomenfraktion gering ist, wird die Deglykosylierung im Anschluss an eine Immunpräzipitation durchgeführt (3.3.8). Zur Entfernung der Zuckerreste vom Protein durch das Enzym, muss das Protein im denaturierten Zustand vorliegen, was durch Erhitzen der Probe erreicht wird. Für die enzymatische Reaktion wird der Ansatz noch für ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei allen Deglykosylierungs-Versuchen, die nach einer IP von TRPV5 durchgeführt wurden, ist entweder kein Protein mehr zu detektieren, oder bei relativ kurzen Inkubationszeiten, hat sich das Proteilmuster im Western Blot nicht verändert (Abb. nicht gezeigt). Alternativ wurde die Deglykosylierung deshalb mit einer Immunpräzipitation aus COS-Zellen, die mit der murinen TRPV5 cDNA transfiziert sind, durchgeführt. Wie in Abb. 30 A dargestellt, verändert sich das detektierte Proteilmuster im Western Blot nach einer Inkubation mit der PNGase F. Ein Protein (MW 90 kDa) wird in den IPs ohne PNGase F-Behandlung detektiert (Pfeil "g"), was nach der Behandlung mit PNGase F fast vollständig verschwindet und dort bei einem geringeren Molekulargewicht eine zusätzliche Proteinbande detektiert wird (Pfeil "ng"). Dieses Experiment konnte allerdings nur einmal durchgeführt werden und liefert nur einen

Hinweis darauf, dass das Protein bei einem Molekulargewicht von ~90 kDa tatsächlich die glykosylierte Form sein könnte. Um eine definitive Aussage treffen zu können, müsste das Experiment mehrmals bestätigt werden.

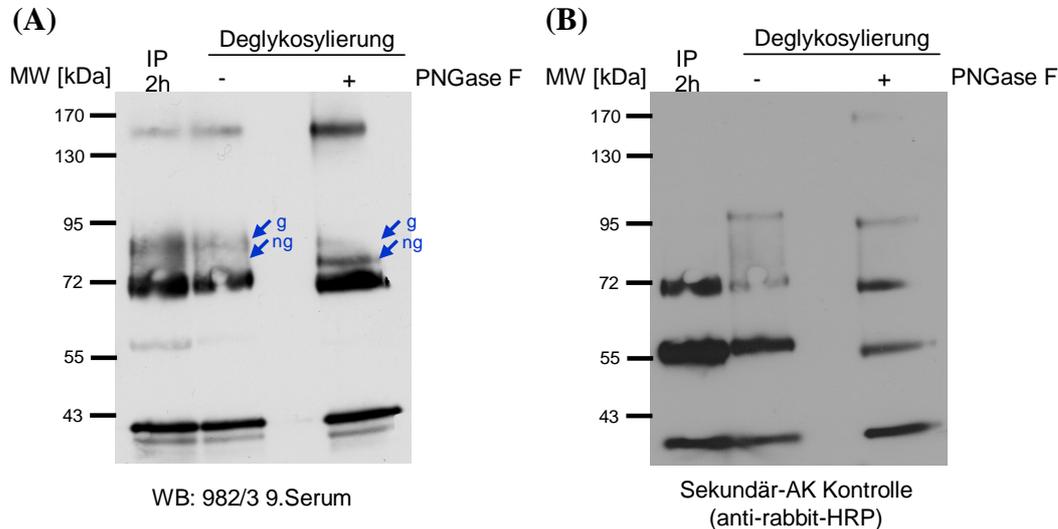


Abb. 30: Deglykosylierung von TRPV5 aus transfizierten COS-Zellen nach einer IP.

Mit der murinen TRPV5-cDNA transfizierte COS-Zellen werden geerntet und das Zellpellet aufgeschlossen. Nach Solubilisierung des Lysats mit Triton X-100 wird dieses für eine IP eingesetzt. Die Proteine werden entweder direkt von der Säule eluiert (IP 2h) oder vor der Elution mit der Deglykosidase PNGase F behandelt (Deglykosylierung +PNGase F). Als Kontrolle wird ein IP Ansatz behandelt wie bei der Deglykosylierung, aber ohne PNGase F Zugabe (Deglykosylierung -PNGase F). Die IP wird im SDS-Gel mit anschließendem Western Blot analysiert. (A) Primärantikörper: 982/3 9.Serum, Sekundärantikörper: anti-rabbit-HRP 1:30000. (B) Sekundärantikörperkontrolle, anti-rabbit-HRP 1:30000

4.3.5 Immunpräzipitation aus Maus-Nierengewebe

Mit dem Antikörper 982/3 wird weiterhin eine IP aus Mausnierenextrakten (3.3.2) durchgeführt. In dem gezeigten Western Blot ist zum Vergleich noch eine IP aus humaner Plazenta mit aufgetragen (Abb. 31). In beiden Spuren mit den IPs wird ein Protein bei 80 kDa detektiert, wobei die Proteinbande für die Niere wesentlich stärker ist, als die aus der humanen Plazenta, obwohl für die Solubilisierung gleiche Ausgangsmengen an Proteinen eingesetzt wurden. Die Bande bei ca. 55 kDa repräsentiert wie bei den anderen IPs, die eingesetzten IgGs. Weder in der IPs aus dem Plazentagewebe noch bei dem Nierengewebe tritt hier eine Doppelbande auf, wie sie bei anderen IPs (Abb. 29) gezeigt werden konnte. In den IPs aus Plazenta konnten die zwei Proteinformen in etwa 42% aller IPs nachgewiesen werden, in allen IPs aus Maus-Niere (n=4) wurde immer nur ein Protein auf der gezeigten Höhe detektiert. Eine Zweitantikörperkontrolle (Abb. 31 B) mit dem verwendeten anti-rabbit-HRP Sekundärantikörper, die negativ ist, zeigt, dass die detektierten Signale vom TRPV5-Erstantikörper stammen.

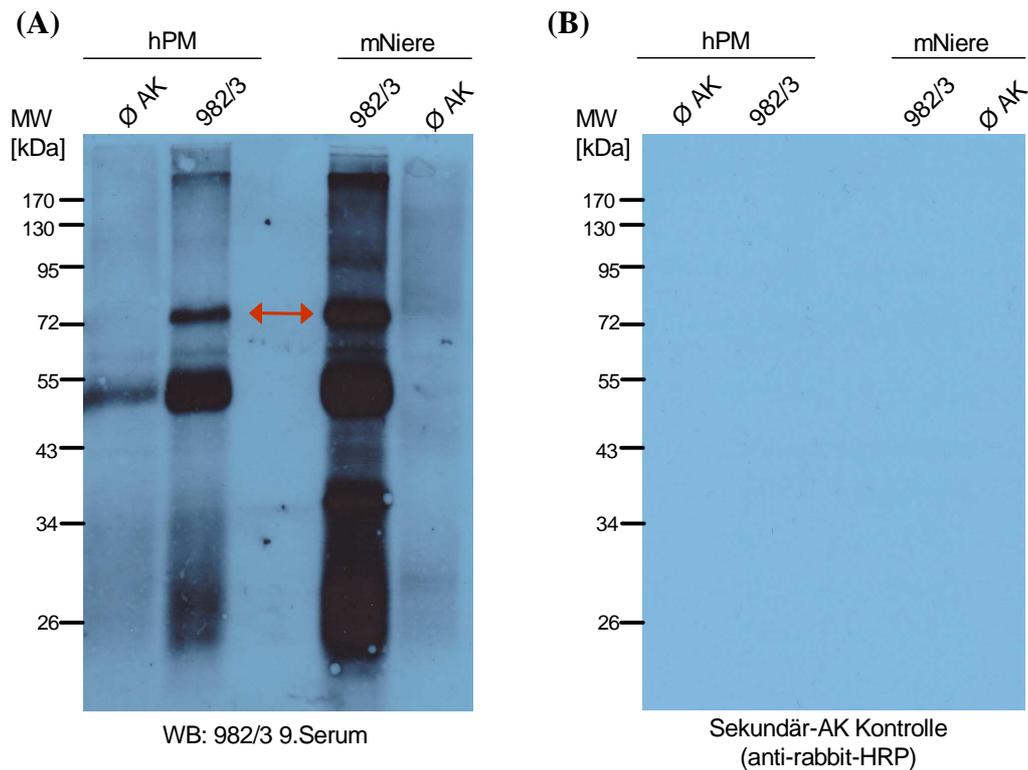


Abb. 31: Immunpräzipitation von TRPV5 aus Maus-Nierenhomogenat.

Aus Maus-Nieren wurde ein Homogenat hergestellt und für jede Immunpräzipitation 20 mg Gesamtprotein solubilisiert. Nach der IP werden die Proteine im SDS-Gel (10%) aufgetrennt und im Western Blot analysiert (IP mNiere 982/3). Zur Kontrolle ist eine IP nur mit Protein A-Agarose ohne Antikörper durchgeführt worden (IP mNiere Ø AK). Auf dem Gel ist zusätzlich eine IP aus humanen Plazentamikrosomen aufgetragen, durchgeführt mit (IP 982/3) und ohne Antikörper (IP 982/3 Ø AK). (A) Inkubation mit Antikörper 982/3 9.Serum, Sekundärantikörper anti-rabbit HRP 1:30000. (B) Sekundärantikörperkontrolle anti-rabbit HRP 1:30000. Roter Pfeil: immunpräzipitiertes TRPV5 Protein.

4.3.6 Immunpräzipitationen mit weiteren TRPV5 Antikörpern

Nachdem die Immunpräzipitation von TRPV5 mit einem affinitätsgereinigten Antikörper etabliert wurde, werden auch die anderen drei charakterisierten polyklonalen TRPV5 Antikörper 1052, 1074 und 1075 für die Immunpräzipitation ausgetestet. Die IP wird mit humanen Plazentamikrosomen durchgeführt, wie für den Antikörper 982/3 beschrieben und im Western Blot analysiert. In Abb. 32 A wird in der Spur mit der IP mit dem Antikörper 982/3, wie bei den vorher gezeigten IPs auch, eine deutliche Doppelbande zwischen 72 und 95 kDa nachgewiesen, allerdings kann in keiner der Spuren mit den IPs der anderen TRPV5 Antikörper ein TRPV5-spezifisches Antikörper-Signal auf der gleichen Höhe nachgewiesen werden. In der Spur mit der Kontroll-IP ohne Antikörper wird kein Signal detektiert und in den Mikrosomen ist eine schwache Bande im gleichen Größenbereich wie bei der IP mit Antikörper 982/3 zu sehen. Auch auf diesem Blot ist zur Kontrolle eine IP mit dem TRPV6

Antikörper 981 aufgetragen und bei Inkubation der Membran mit dem monoklonalen TRPV6-Antikörper 26B3 kann ein Signal für TRPV6 bei ~83 und 95 kDa nachgewiesen werden (Abb. 32 B).

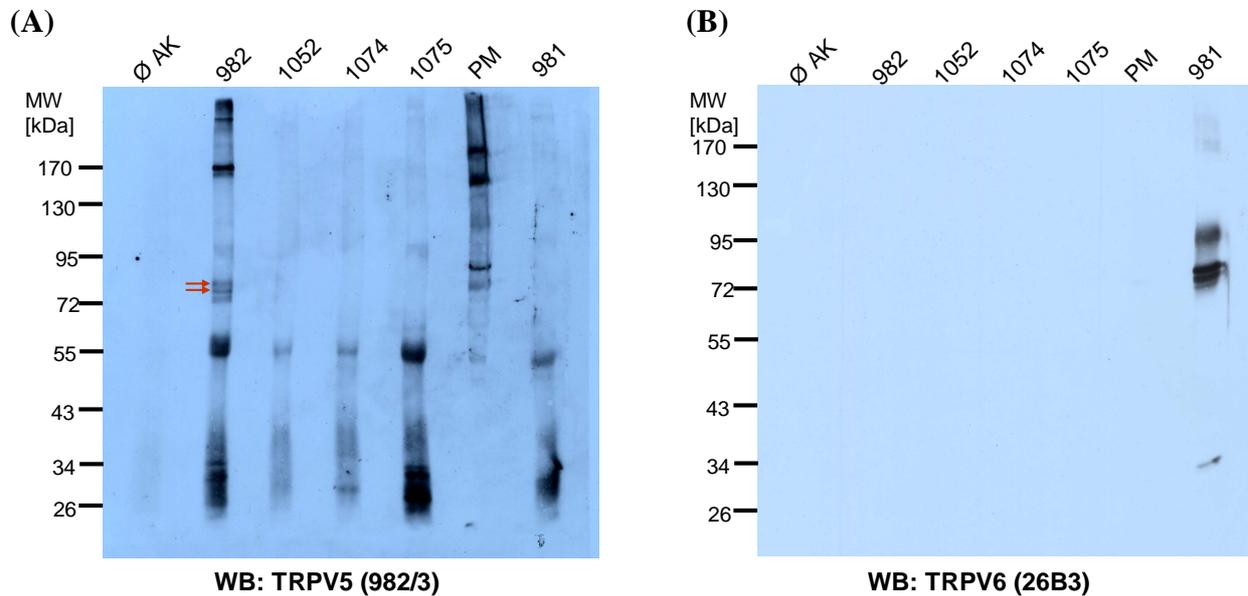


Abb. 32: Immunpräzipitation mit den vier verschiedenen TRPV5 Antikörpern

Für die Immunpräzipitation werden pro Ansatz 20 mg Plazentamikrosomen mit Triton X-100 solubilisiert und mit Antikörper-gekoppelter Agarose inkubiert. Die eluierten Proteine werden im Western Blot analysiert. (A) Western Blot Inkubation mit Antikörper 982/3 9.Serum. (B) Western Blot Inkubation mit dem TRPV6 Antikörper 26B3. Ø AK: IP ohne Antikörper ; 982: IP mit Antikörper 982/3; 1052: IP mit Antikörper 1052; 1074: IP mit Antikörper 1074; 1075: IP mit Antikörper 1075; PM: 400µg Plazentamikrosomen; 981: IP mit TRPV6 Antikörper 981. Pfeile: immunpräzipitierte TRPV5 Proteine

Zusätzlich zu den gezeigten IPs werden vom Antikörper 982/3 die Seren 7-11 und die Seren zwei weiterer Tiere, die mit dem Peptid 982 immunisiert wurden (982/4 und 982/5) sowie von den drei Antikörpern 1052, 1074 und 1075 jeweils vom vierten bis zum Endserum (7. Serum) für IP eingesetzt, aber mit keinem konnte das TRPV5 Protein immunpräzipitiert werden. Es wurden soweit vorhanden die affinitätsgereinigten Seren (siehe Tabelle 17) für die IP eingesetzt, andernfalls wurden 20 µl Serum verwendet. Im weiteren Verlauf werden deshalb verschiedene Kombinationen von affinitätsgereinigten TRPV5 Antikörpern für die Immunpräzipitation ausprobiert, um damit möglicherweise eine höhere Spezifität zu erreichen. Die einzigste ausgetestete Kombination, die erfolgreich ist, besteht aus zwei TRPV5-Antikörpern mit unterschiedlichem Epitop (982/3 11.Serum + 1052 6.Serum), wenn auch damit nicht so starke Signale erzielt werden können wie mit dem 9.Serum von Antikörper 982/3 alleine (Abb. 33).

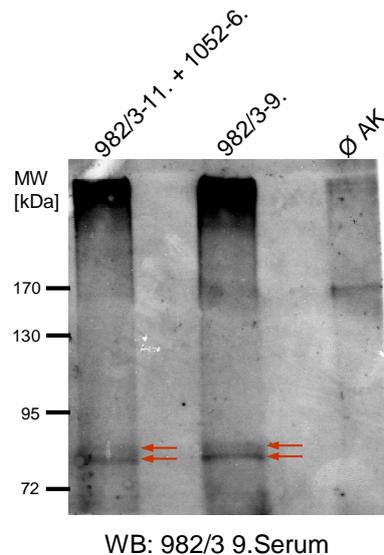


Abb. 33: Immunpräzipitation von TRPV5 durch Kombination von Antikörpern.

Zur Immunpräzipitation von TRPV5 aus humanen Plazentamikrosomen wurde nach der Solubilisierung mit Triton X-100 das Solubilisat mit Protein A-Sepharose inkubiert, an die zwei verschiedene TRPV5 Antikörper – gekoppelt sind. Primärantikörper im Western Blot: 982/3 9.Serum; Sekundär-antikörper: anti-rabbit-LC HRP 1:30000. Pfeile: immunpräzipitiertes TRPV5 Protein

Für weitere Affinitätsreinigungen von TRPV5 soll eine Antikörper-Affinitätssäule hergestellt werden, für die die Menge an 982/3 9.Serum alleine nicht ausreicht. Diese kann daher mit der oben erwähnten Kombination aus den beiden TRPV5-Antikörpern hergestellt werden. Zuvor wird allerdings getestet, ob sich TRPV5 auch durch eine Immunpräzipitation so stark anreichern lässt, dass es massenspektrometrisch nachzuweisen ist.

4.3.7 Immunpräzipitation zum massenspektrometrischen Nachweis von TRPV5

Für einen späteren massenspektrometrischen Nachweis von TRPV5 und möglicher assoziierter Proteine wird für eine präparative IP mit dem Antikörper 982/3 9.Serum der IP-Ansatz (Tabelle 9) vervierfacht. Aus dem Blue Silver-gefärbten Gel nach der IP werden einzelnen Banden der IPs mit 982/3 9.Serum oder Präimmunserum (Negativkontrolle) in dem Bereich ausgeschnitten, bei dem im Western Blot mit dem TRPV5 Antikörper bei ca. 80 kDa Signale detektiert werden. Die in Abb. 34 markierten Banden (nummerierte Kästen) werden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und im ESI-Massenspektrometer auf enthaltene Proteine analysiert (Tabelle 19).

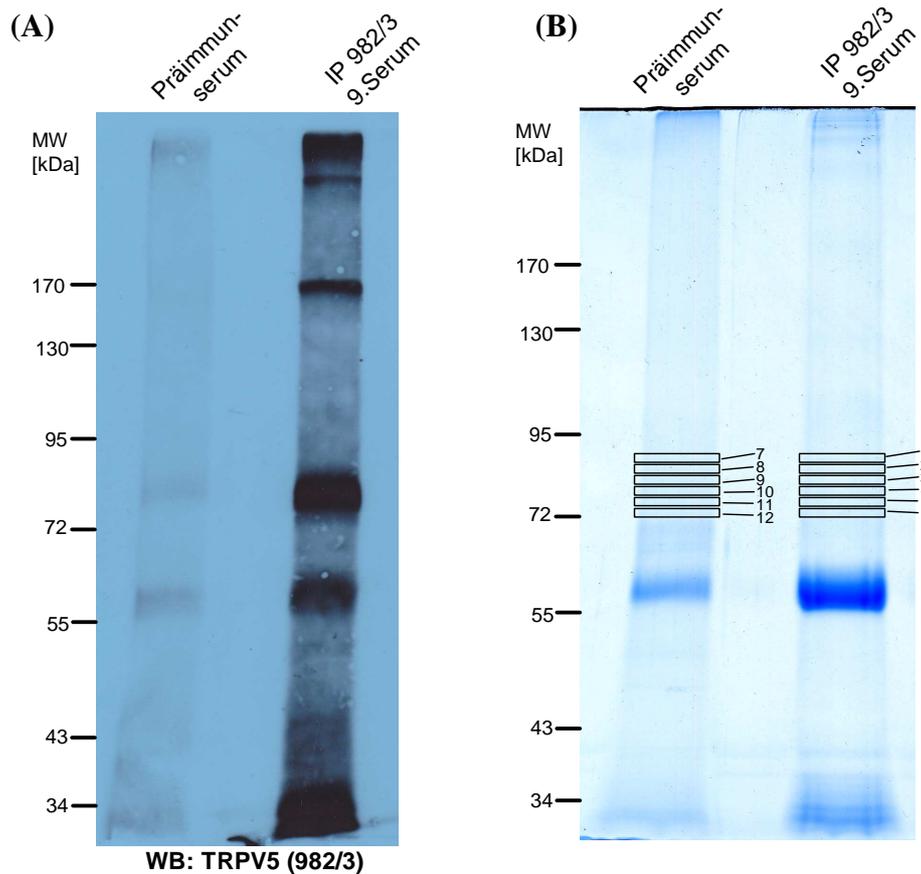


Abb. 34: Präparative IP von TRPV5 aus humaner Plazenta und Isolierung von Banden zur massenspektrometrischen Analyse.

Für die Immunpräzipitationen, die mit dem Antikörper 982/3 9.Serum und dem Präimmunsrum durchgeführt wurden, wurden 80 mg Mikrosomen pro Ansatz solubilisiert und mit entsprechender Menge gekoppelter Protein A-Agarose inkubiert. Von den Eluaten der IP wurde $\frac{1}{4}$ für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot verwendet (A), der Rest wurde in einem Gel aufgetrennt und anschließend Blue Silver gefärbt (B). Der Western Blot wurde mit Antikörper 982/3 9.Serum entwickelt, und aus dem gefärbten Gel auf der gleichen Höhe Banden ausgeschnitten, die im Western Blot durch den Antikörper detektiert werden. Die nummerierten Kästen entsprechen den ausgeschnittenen Banden, die massenspektrometrisch analysiert wurden.

Tabelle 19: Liste der mittels ESI-Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den in Abb. 34 markierten Banden. Der Score ist ab einem Wert von 34 signifikant

Bande	IPI-Nr.	MW Protein [Da]	Score:	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
1	IPI00003362	72377	136	13 (1)	HSPA5 / HSPA5 protein
1	IPI00477090	51805	168	7 (2)	- / - Protein
4	IPI00791534	103811	558	24 (5)	- / 104 kDa protein
4	IPI00926256	101727	558	24 (5)	SLC4A1 / Band 3 anion transport protein
4	IPI00021439	41710	445	17 (4)	ACTB / Actin, cytoplasmic 1
4	IPI00384938	52819	163	7 (2)	IGHV4-31 / IGHG1 Putative uncharacterized protein D
4	IPI00550731	26218	111	4 (1)	- / Putative uncharacterized protein
4	IPI00154742	24777	106	6 (2)	LOC100290481/ IGLV2-14
4	IPI00246994	42427	94	4 (1)	HSD3B1 / Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase 3

4	IPI00455315	38580	93	9 (1)	ANXA2 Annexin A2
4	IPI00218918	38690	81	5 (1)	ANXA1 Annexin A1
4	IPI00646304	23728	77	2 (1)	PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Cyclophilin B)
4	IPI00399007	46032	69	5 (1)	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196

Die Auswertung der massenspektrometrischen Analyse zeigt, dass TRPV5 in keiner der Banden detektiert werden kann, auch nicht in dem Bereich, in dem im Western Blot Signale vom TRPV5 Antikörper nachgewiesen werden. In dem Blue Silver-gefärbten Gel werden bei einem Molekulargewicht zwischen 70 kDa und 100 kDa nur kaum sichtbare Banden angefärbt. Die Proteine, die in dem Bereich von etwa 80 kDa massenspektrometrisch identifiziert werden sind in Tabelle 19 dargestellt. Proteine die nach der IP mit dem Präimmenserum (Negativkontrolle) ebenfalls identifiziert wurden, sind in der Tabelle nicht aufgeführt (siehe Anhang), so dass nur in zwei ausgeschnittenen Banden (Nr. 1 und Nr.4) Proteine mit signifikantem Score identifiziert wurden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass vier TRPV5 Antikörper validiert werden konnten, die sowohl N- als auch C-terminale Bereiche des TRPV5 Proteins spezifisch erkennen. Der Antikörper 982/3 kann sowohl für Western Blots, Immunpräzipitation und immunhistochemische Untersuchungen angewendet werden, wobei er für Western Blot Analysen und IPs am besten geeignet ist. Der Antikörper 1052 ist ebenfalls zur Detektion von TRPV5 in Western Blot Analysen geeignet, und zeigt die spezifischste Färbung in der Immunhistochemie mit humaner Plazenta. Für IPs kann er allerdings nur in Kombination zusammen mit anderen Antikörpern eingesetzt werden. Antikörper 1074 und 1075 eignen sich nur zum Nachweis des TRPV5 Proteins mittels Western Blot Analysen. Zudem wird mit den Experimenten der TRPV5 Antikörper im Western Blot gezeigt, dass TRPV5 Proteine in der humanen Plazenta auf Proteinebene tatsächlich exprimiert werden.

4.4 Antikörper-Affinitätschromatographie mit TRPV5

Da eine IP nicht ausreicht, um das TRPV5 Protein in größerer Menge anzureichern und massenspektrometrisch zu detektieren, wird eine Antikörper-Affinitätschromatographie durchgeführt. Durch die Herstellung einer Antikörper-Affinitätssäule, die im Prinzip eingesetzt werden kann wie die mit Antikörpern gekoppelte Protein A-Agarose bei der IP, können wesentlich größere Proteinmengen in einem Versuch analysiert werden. Zunächst

werden dazu die affinitätsgereinigten Antikörper kovalent an ein Chromatographie-Säulenmaterial gekoppelt.

4.4.1 Vergleich der kovalenten Kopplung von TRPV5 Antikörpern an Protein A- oder AminoLink-Agarose

Um die Antikörper kovalent an ein Säulenmaterial zu koppeln, werden zwei unterschiedliche Kopplungsmethoden miteinander verglichen. Hierbei wird einmal die Kopplung der Antikörper an Protein A-Agarose mit anschließendem Quervernetzen sowie das Koppeln über primäre Amine an eine aktivierte Aldehydgruppe ausgetestet. Für die kovalente Kopplung an Protein A werden die Antikörper mit dem Säulenmaterial inkubiert und binden über ihren F_c-Teil an Protein A. Durch Zugabe des Quervernetzlers DSS (Disuccinimidyl-Suberat) erfolgt die kovalente Verknüpfung von Protein A und Antikörper. Die Stabilität der Bindung wird durch eine Inkubation des Säulenmaterials mit stark saurem 0,1 M Glycin (pH 2,2) getestet, welches nicht-kovalente Bindungen löst und die ungekoppelten Antikörper so im Eluat zu finden sind. Bei der AminoLink-Kopplung reagieren die primären Amine der Antikörper mit einer aktivierten Gruppe am Säulenmaterial und unter Einwirkung von Cyanoborohydrid entstehen die kovalenten Bindungen. Die Überprüfung der Stabilität der Bindung erfolgt ebenfalls durch Inkubation mit Glycin. Gekoppelt wird in beiden Fällen das 9.Serum und das 11. Serum des Tieres 982/3 und der Verlauf der einzelnen Schritte wird im Western Blot verfolgt (Abb. 35).

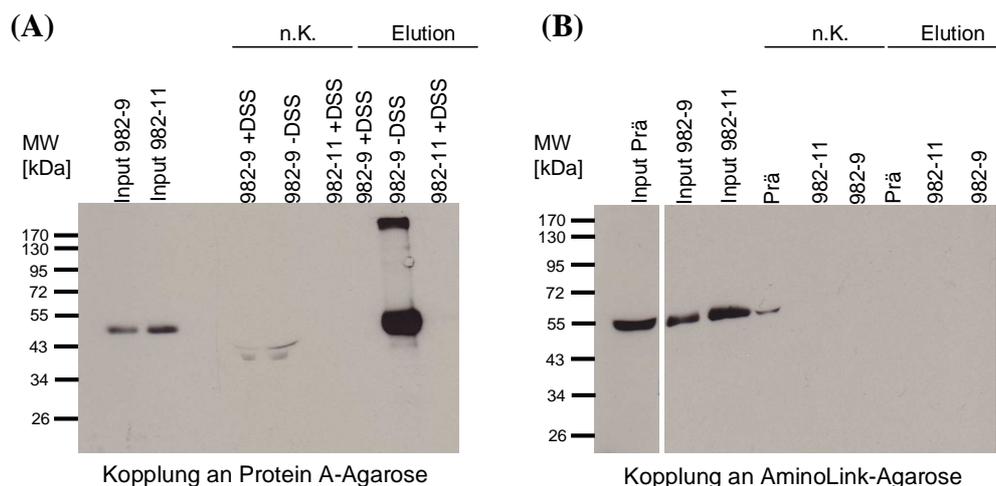


Abb. 35: Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Agarose und AminoLink-Agarose. Zum Vergleich der beiden Kopplungsvarianten werden die Antikörper entweder an Protein A Agarose gebunden und anschließend quervernetzt oder die Bindung der Antikörper erfolgt an die AminoLink Agarose über primäre Aminreste der Antikörper. Von den einzelnen Kopplungsschritten wurden jeweils Proben entnommen und diese im Western Blot analysiert. Die Detektion der Antikörper erfolgt mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit HRP 1:50000. (A) Kontrolle der Kopplung an Protein A Agarose. (B) Kontrolle der Kopplung an AminoLink Agarose. Input: 1 µg Antikörper-Lösung vor der Kopplung; n.K.: komplette AK-Lösung nach Koppeln; Elution: eluierte AK nach Inkubation der gekoppelten Sepharose mit 0,1 M Glycin (pH2,2); + DSS: Zugabe von DSS beim Koppeln; -DSS: keine Zugabe von DSS beim Koppeln. AK die für die Kopplung verwendet wurden: 982/3 9.Serum (982-9); 982/3 11.Serum (982-11) und Präimmuneserum (Prä)

Abb. 35 A zeigt die Kopplung an Protein A-Agarose, wobei zur Kontrolle ein Ansatz mit DSS und ein weiterer ohne DSS inkubiert wird. Von den zwei verschiedenen Antikörpern, die eingesetzt werden ist 1 µg aufgetragen (Input) und daneben der verbleibende ungebundene Rest der Antikörper-Lösung nach der Kopplung (n.K.). Bei der Detektion der eingesetzten Antikörper in den Ansätzen mit dem 9.Serum werden geringe Mengen des ungekoppelten Antikörpers nachgewiesen, beim Koppeln von 982/3 11.Serum ist nach der Kopplung im Western Blot kein Antikörper mehr nachweisbar, so dass davon auszugehen ist, dass alle Antikörper an die Protein A-Agarose gebunden haben. Nach der Inkubation des Säulenmaterials mit Glycin, ist in den Eluaten der beiden Ansätzen mit Zugabe von DSS (9.Serum und 11. Serum) ebenfalls kein Antikörper nachzuweisen, aber in dem Ansatz, bei dem kein Quervernetzer zugegeben wurde (-DSS) ist ein sehr starkes Signal für die Antikörper zu erkennen. Ohne DSS werden die Antikörper, wie erwartet, nicht kovalent gekoppelt und werden dadurch vom Säulenmaterial eluiert, die Quervernetzung aber ist resistent gegenüber dem niedrigen pH-Wert. Das gleiche Ergebnis ist in Abb. 35 B für die Kopplung an die AminoLink-Agarose zu sehen. 1 µg der eingesetzten Antikörper werden im Western Blot deutlich nachgewiesen und nach dem Koppeln ist nur in dem Ansatz des Präimmunserums, was als Negativkontrolle für die später Affinitätsreinigung gekoppelt wird, eine geringe Restmenge an Antikörper nachweisbar. Durch einen niedrigen pH-Wert werden in keinem der Ansätze die kovalent gekoppelten Antikörper vom Säulenmaterial gelöst. Somit können beide Säulen für eine Affinitätsreinigung (3.3.7.3) von TRPV5 Proteinen eingesetzt werden. Im Folgenden wird eine Antikörper-Affinitätssäule im präparativen Ansatz hergestellt. Weitere parallele Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe ergaben, dass die Kopplung von Antikörpern über Protein A Agarose in Affinitätschromatographien bessere Ergebnisse erzielt, als diejenige über AminoLink, weshalb diese Protein A Methode zur Herstellung der präparativen Säule verwendet wird. Dabei werden an 1,5 ml eines Gemischs aus Protein A und Protein G (Verhältnis 2:1) 3,5 mg Antikörper (Kombination aus Antikörper 982/3 11.Serum und 1052 6.Serum) gekoppelt. Als Negativkontrolle für die Affinitätsreinigung dient ein 1:1 Gemisch der beiden Präimmunseren (1052 + 982/3) welches gleichermaßen gekoppelt wird. Die Kopplung der Säule wird wie beim Testen der Methoden mit positivem Ergebnis überprüft und kann somit für eine Antikörper-Affinitätschromatographie eingesetzt werden (Abb. nicht gezeigt).

4.4.2 Antikörper-Affinitätsreinigung von TRPV5

Für die Antikörper-Affinitätschromatographie werden 150-200 mg Plazentamikrosomen mit Triton X-100 als Detergenz solubilisiert, das Solubilisat über Protein A- und Protein G-Agarosematerial vorgereinigt (Preclearing) und über Nacht mit den hergestellten Antikörper-Säulen (TRPV5 Antikörper und Präimmunsäule) inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgt die Elution mit Glycin pH 2,5 in einem Puffer, der 0,1% Triton X-100 enthält, um ein Ausfallen der TRPV5 Proteine zu vermeiden. Um das Volumen zu verringern werden die Eluate durch Ultrafiltration aufkonzentriert und gleichzeitig das Glycin entfernt. Da Triton X-100 mit einer Mizellengröße von 90 kDa beim Einengen der Proben durch die Ultrafiltrationsröhrchen (Ausschlussgröße von 50 kDa) nicht entfernt, sondern durch die Volumenverringerng stark aufkonzentriert wird, würde dieses den Lauf der SDS-PAGE im Anschluss, zur Analyse der Eluate erheblich stören. Deshalb werden die Proben nochmals mit TCA (Trichloressigsäure) gefällt (3.3.4) und direkt in SDS-Probenpuffer gelöst. Die Fällung wird erst nach der Aufkonzentrierung durchgeführt, weil das Elutionsvolumen (>10 ml) für eine direkte Fällung zu groß ist. Die Analyse der Eluate von Präimmun- und TRPV5-Säule im Western Blot ist in Abb. 36 dargestellt.

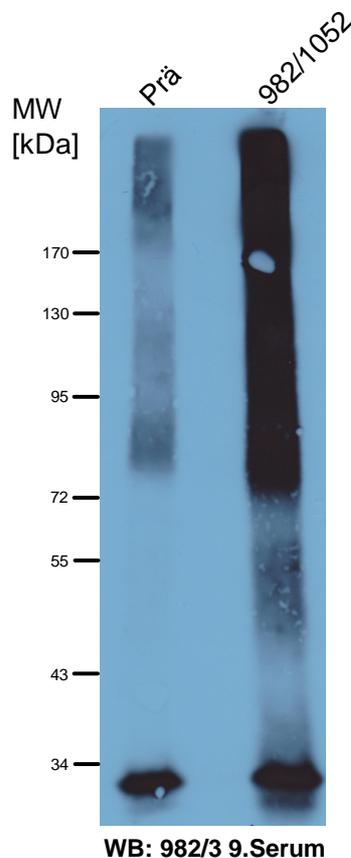


Abb. 36: TRPV5 Antikörper-Affinitätsreinigung aus humaner Plazenta.

180 mg Plazentamikrosomen wurden solubilisiert und mit der TRPV5-Antikörper-Affinitätsäule und der Präimmunsäule über Nacht inkubiert. Nach Waschen des Säulenmaterials werden gebundene Proteine mit 0,1 M Glycin eluiert und nach Aufkonzentration und TCA-Fällung im Western Blot untersucht. Aufgetragen ist von beiden Säulen die Hälfte des Eluats aufgetragen. Prä: Eluat der Präimmunsäule; 982/1052: TRPV5-Antikörpersäule. Primärantikörper: 982/3 9.Serum. Sekundärantikörper: anti-rabbit-LC-HRP 1:30000.

Im dem Eluat von der TRPV5-Antikörper Säule wird ein Signal detektiert, das sich ab einem Molekulargewicht von 70 kDa aufwärts bis zum oberen Rand des Trenngels erstreckt. Es sind keine distinkten Banden nachgewiesen worden, die dem TRPV5 Protein zugeordnet werden können. Über einen ähnlichen Größenbereich, aber wesentlich schwächer in der Signalintensität, erstreckt sich auch ein Signal im Eluat der Präimmunsäule. Die größte Intensität liegt bei etwa 80 kDa, was annähernd dem Molekulargewicht von TRPV5 entspricht. Da das Signal aber auch schwach in der Negativkontrolle auftaucht, kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass durch die Affinitätsreinigung spezifisch TRPV5 angereichert wird. Während dieser Arbeit konnten die Bedingungen für die TRPV5-Affinitätsreinigung nicht optimiert und bessere Ergebnisse erzielt werden, weshalb auch keine massenspektrometrische Analyse der Proben durchgeführt wurde. Zur Identifizierung möglicher TRPV5 Interaktionspartner werden deshalb Pulldown-Experimente mit den klonierten und exprimierten Fusionsproteinen durchgeführt.

4.5 Pulldown-Experimente mit den TRPV5 Fusionsproteinen N7 und C4

4.5.1 GST-TRPV5 Pulldown-Experimente mit humaner Plazenta und anschließender massenspektrometrischer Analyse

Alternativ zu den Affinitätsreinigungen mit Hilfe der TRPV5 Antikörper werden GST-Pulldown-Experimente (3.6) durchgeführt. Dazu werden das gereinigte N-terminale Fusionsprotein N7 (AS 1-330 vom N-Terminus von TRPV5 aus Mensch) und das C-terminalen Fusionsprotein C4 (AS 571-723; C-Terminus aus Maus), mit Proteinextrakten aus Plazentahomogenat und solubilisierten Mikrosomen aus humaner Plazenta inkubiert, um mögliche Interaktionspartner von TRPV5 zu identifizieren. Die Fusionsproteine werden dazu über ihren GST-tag an Glutathion-Agarose gekoppelt. Zur Solubilisierung wird wie für die Immunpräzipitationen auch, Triton X-100 als Detergenz verwendet. Die erhaltenen Eluate werden dann in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine anschließende Blue Silver-Färbung die Proteine visualisiert (Abb. 37 + Abb. 38). Zu jedem Versuch wird ein Ansatz mit dem GST-Protein, welches ebenfalls an Glutathion-Agarose gekoppelt ist, als Negativkontrolle durchgeführt. Ein Teil der im Folgenden gezeigten Pulldown-Experimente und SDS-PAGE Gele wurden von Frau Viktoria Käfer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit [2009] angefertigt, welche jeweils gekennzeichnet sind.

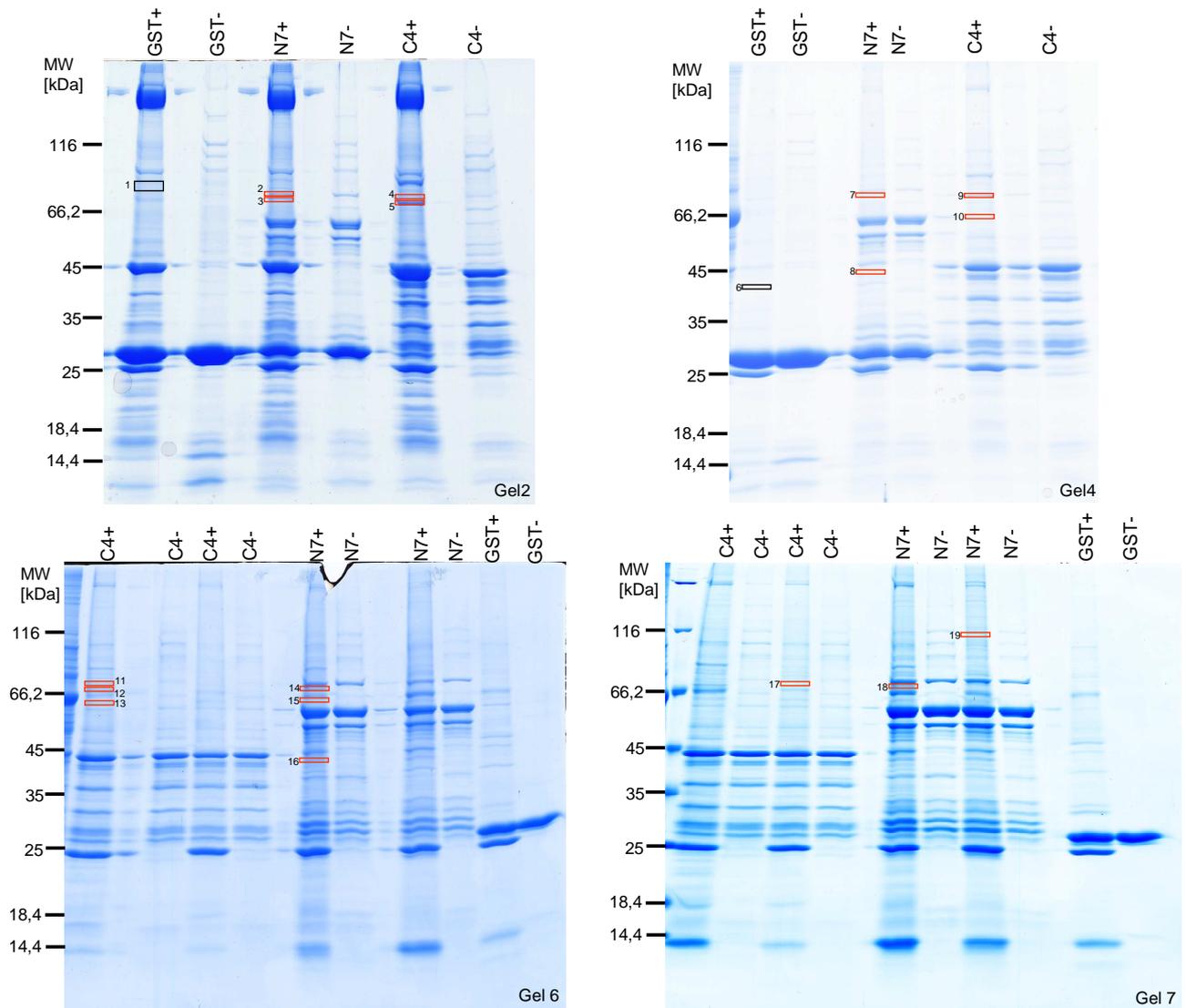


Abb. 37: Pulldown mit TRPV5 Fusionsproteinen aus Plazentahomogenat.

Für den Pulldown mit den TRPV5 Fusionsproteinen N7 und C4 wird ein Homogenat aus Plazentagewebe hergestellt, mit Triton X-100 solubilisiert und das Solubilisat mit den Fusionsproteinen inkubiert. Nach dem Waschen der Proben werden diese mit 2x SDS Probenpuffer von der Glutathion-Agarose gelöst und in einem Gradientengel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteine werden die Gele mit Blue Silver angefärbt. Die Nummern der Gele werden in Tabelle 20 -23 verwendet. Die umrandeten Banden entsprechen den in Tabelle 24 angegebenen Banden. (+): Ansatz wurde mit Plazentahomogenat inkubiert; (-): Ansatz wurde nur mit Extraktionspuffer inkubiert. Die Gele 2, 4 und 6 wurden in Rahmen der Bachelorarbeit von Viktoria Käfer (2009) hergestellt.

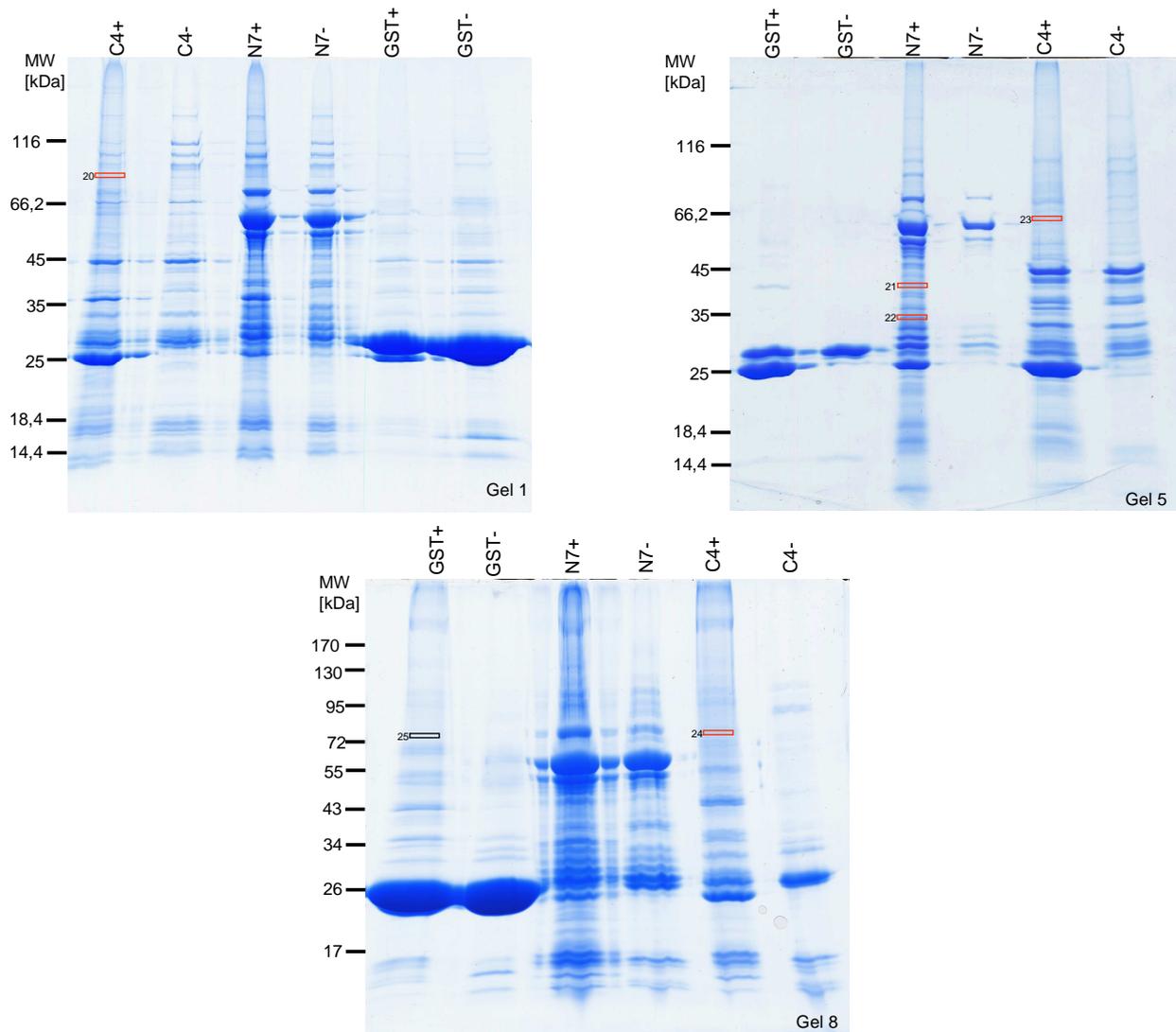


Abb. 38: Pulldown mit TRPV5 Fusionsproteinen aus Plazentamikrosomen.

Für den Pulldown mit den TRPV5 Fusionsproteinen N7 und C4 werden Plazentamikrosomen verwendet und mit Triton X-100 solubilisiert. Das Solubilisat wird mit den Fusionsproteinen inkubiert und nach dem Waschen der Proben werden diese mit 2xSDS Probenpuffer von der Glutathion-Agarose gelöst und in einem Gradientengel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteine werden die Gele mit Blue Silver angefärbt. Die Nummern der Gele werden in Tabelle 20 -23 verwendet. Die umrandeten Banden entsprechen den in Tabelle 24 angegebenen Banden. (+): Ansatz wurde mit Solubilisat inkubiert; (-): Ansatz wurde nur mit Extraktionspuffer inkubiert. Die Gele 1 und 5 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Viktoria Käfer (2009) hergestellt.

Auf jedem Gel wird immer ein kompletter Pulldown-Versuch, durchgeführt mit den Proteinen GST, GST-N7 (N7) und GST-C4 (C4) als Fänger-Protein, aufgetragen, wobei für jeden Versuch eine andere Plazenta benutzt wird. Neben einer Inkubation der Proteine mit dem Gewebesolubilisat (GST+ / N7+ / C4+) werden als weitere Kontrolle in einem Ansatz die Proteine nur mit dem verwendeten Extraktionspuffer inkubiert (GST- / N7- / C4-). Der GST Ansatz dient jeweils als Negativkontrolle. In den Spuren der Inkubation von Fusionsprotein mit dem Extraktionspuffer allein, sind neben den eigentlichen Fusionsproteinen bzw. GST

noch weitere Proteine zu finden (Abb. 37 + Abb. 38; Spuren mit "-" gekennzeichnet). Diese stammen aus dem Bakterienextrakt, aus dem die GST-Fusionsproteine aufgereinigt wurden (3.2.2) und sind noch an die Glutathion-Agarose gebunden. In den Spuren mit den Ansätzen mit Plazentahomogenat/-mikrosomen sind im Vergleich zu denen, die nur mit Extraktionspuffer inkubiert wurden wesentlich mehr Banden zu erkennen. Eine Proteinbande, die in mehreren Ansätzen auftritt, hat ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa. Dieses Protein ist sowohl bei den Versuchen mit Plazentahomogenat als auch mit den Mikrosomen vorhanden. Die stärksten Proteinbanden in allen Spuren stammen jeweils von dem eingesetzten GST-(Fusions-)Protein. Nach einem detaillierten optischen Vergleich der Proteinbanden in den Gelspuren mit den Fusionsproteinen und dem GST werden diejenigen Proteinbanden ausgeschnitten, die nicht in dem GST Ansatz zu finden sind, sondern nur bei den N- und C-terminalen Fusionsproteinen. Zur Kontrolle werden auf der gleichen Höhe, auf der eine Bande aus den Spuren der Fusionsproteine ausgeschnitten wird auch in der GST-Spur geschnitten, da durch die Färbung Proteine unterhalb der Nachweisgrenze nicht zu sehen sind, aber trotzdem vorhanden sein können (Abb. siehe Anhang). Aus den sieben gezeigten Gelen werden so 257 Banden ausgeschnitten und dann für die ESI-massenspektrometrische Analyse vorbereitet, mit Trypsin verdaut und anschließend die Peptide extrahiert (3.7). Die Analyse der Proben im ESI-Massenspektrometer wurde von Herrn Dipl. Biochem. Thomas Schulenburg, AG Friauf, TU Kaiserslautern durchgeführt und die Daten im PKL-Format zur Verfügung gestellt. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung der Software Mascot Daemon 2.1 mit einer humanen Datenbank (IPI Human, Swiss-Prot). Zur Vereinfachung der Datenmenge werden die Banden einer kompletten Spur im Gel kombiniert und ausgewertet. Die in den GST-Spuren identifizierten Proteine (siehe Tabelle im Anhang) werden bei der Auswertung der gefundenen Proteine für TRPV5-N7 und -C4 eliminiert. Alle Proteine, die nicht durch Auftreten bei GST-Proben (Negativkontrolle) aussortiert wurden, sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 für N7 und in Tabelle 22 und Tabelle 23 für C4 dargestellt. Bei der Auswertung gilt ein Protein dann als signifikant identifiziert, wenn der Gesamtscore über der Signifikanzgrenze (meistens 36) liegt, mindestens eines der gefundenen Peptide einen signifikanten Score aufweist und das Protein mindestens in zwei unabhängigen Versuchen identifiziert wird. Insgesamt werden nach diesen Kriterien mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse 38 verschiedene Proteine identifiziert.

Tabelle 20: Liste der durch ESI-Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den Pulldowns mit dem GST-Fusionsprotein N7 aus Plazentahomogenat. Das Molekulargewicht (MW) der gefundenen Proteine ist in Da angegeben, der Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Protein identifiziert wurde und ist ab einem Wert von 36 signifikant (außer Gel 6, signifikant ab 35). Die Anzahl gefundener Peptide gibt an, wie viele individuelle Peptide identifiziert wurden, die dem Protein zugeordnet werden können. Zahlen in Klammern sind angegeben, wenn weniger als 3 einzelne Peptide signifikant sind. Proteine die fettrot geschrieben sind, werden in weiteren Versuchen untersucht.

Gel #	IPI-Nr.	MW Protein [Da]	Score	Anzahl individuell gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Protein Name
Gel2	IPI00939498	29000	41	8 (1)	- 29 kDa protein
Gel4	IPI00939498	29000	36	6 (1)	- 29 kDa protein
Gel2	IPI00007289	59482	296	7	ALPP Alkaline phosphatase, placental type
Gel7	IPI00007289	59482	537	8	ALPP Alkaline phosphatase, placental type
Gel4	IPI00002547	74529	44	14 (1)	CAPN6 Calpain-6
Gel7	IPI00002547	74529	214	24	CAPN6 Calpain-6
Gel6	IPI00909570	62810	51	10 (1)	EEF2 cDNA FLJ56548, highly similar to Elongation factor 2
Gel7	IPI00186290	95277	39	5 (1)	EEF2 Elongation factor 2
Gel2	IPI00654755	15988	77	5 (1)	HBB Hemoglobin subunit beta
Gel7	IPI00220706	16130	44	3 (1)	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1
Gel4	IPI00300050	44098	236	18	HSD11B2 Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2
Gel6	IPI00300050	44098	71	5 (1)	HSD11B2 Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2
Gel4	IPI00007702	69978	67	7 (1)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2
Gel6	IPI00007702	69978	84	7 (1)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2
Gel7	IPI00479743	121286	490	20	POTEE Isoform 1 of POTE ankyrin domain family member E
Gel6	IPI00479743	121286	887	37	POTEE Isoform 1 of POTE ankyrin domain family member E
Gel2	IPI00024915	22012	365	13	PRDX5 Isoform of Peroxiredoxin-5, mitochondrial
Gel6	IPI00943960	35327	40	1 (1)	RCE1 RCE1 protein (Fragment)
Gel7	IPI00943960	35327	39	3	RCE1 RCE1 protein (Fragment)
Gel7	IPI00376798	20240	101	3 (2)	RPL11 60S ribosomal protein L11
Gel7	IPI00413324	21383	45	7 (1)	RPL17 60S ribosomal protein L17
Gel7	IPI00247583	18553	87	5 (1)	RPL21 60S ribosomal protein L21
Gel7	IPI00021266	17684	58	4 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
Gel7	IPI00221088	22578	62	12 (1)	RPS9 40S ribosomal protein S9
Gel7	IPI00010204	19318	49	5 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
Gel2	IPI00302133	82497	85	11 (2)	TRPV5
Gel4	IPI00302133	82497	140	25	TRPV5
Gel6	IPI00302133	82497	222	28	TRPV5
Gel2	IPI00644712	69799	582	45	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
Gel4	IPI00644712	69799	245	23	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
Gel6	IPI00644712	69799	530	35	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
Gel7	IPI00644712	69799	288	20	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1

Tabelle 21: Liste der durch ESI-Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den Pulldowns mit dem GST-Fusionsprotein N7 aus Plazentamikrosomen. Das Molekulargewicht (MW) der gefundenen Proteine ist in Da angegeben, der Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Protein identifiziert wurde und ist ab einem Wert von 36 signifikant. Die Anzahl gefundener Peptide gibt an, wie viele individuelle Peptide gefunden wurden, die dem Protein zugeordnet werden können. Zahlen in Klammern sind geben an, wenn weniger als 3 einzelne Peptide signifikant sind.

Gel #	IPI-Nr.	MW Protein [Da]	Score	Anzahl individuell gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
Gel1	IPI00064350		52	1 (3)	C12orf52 Isoform 1 of Uncharacterized protein C12orf52
Gel5	IPI00012074	70899	50	2 (1)	HNRNPR Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
Gel5	IPI00935718	5660	51	1 (3)	LOC100293239;LOC100290044;LOC100289018 hypothetical protein XP_002342868
Gel8	IPI00935718	5560	39	1 (1)	LOC100293239;LOC100290044;LOC100289018 hypothetical protein XP_002342868
Gel1	IPI00008483	59644	47	1 (1)	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A (bzw. B)
Gel8	IPI00019502	226392	68	18	MYH9 Isoform 1 of Myosin-9
Gel8	IPI00024915	22012	147	6	PRDX5 Isoform Mitochondrial of Peroxiredoxin-5, mitochondrial
Gel1	IPI00376798	20240	123	10	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11
Gel8	IPI00413324	21989	170	15	RPL17 60S ribosomal protein L17
Gel1	IPI00215719	21621	110	1 (1)	RPL18 60S ribosomal protein L18
Gel8	IPI00215719	21621	150	5 (2)	RPL18 60S ribosomal protein L18
Gel1	IPI00247583	18553	68	3 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
Gel8	IPI00247583	18553	129	10 (2)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
Gel8	IPI00219153	14778	141	3 (2)	RPL22 60S ribosomal protein L22
Gel1	IPI00021266	17684	214	12	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
Gel8	IPI00021266	17684	132	3 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
Gel8	IPI00219155	15788	125	5	RPL27 60S ribosomal protein L27
Gel5	IPI00550021	46080	58	2 (1)	RPL3 60S ribosomal protein L3
Gel5	IPI00003918	47667	140	16	RPL4 60S ribosomal protein L4
Gel1	IPI00025091	18419	59	5 (1)	RPS11 40S ribosomal protein S11
Gel8	IPI00026271	16263	181	1(4)	RPS14 40S ribosomal protein S14
Gel8	IPI00013296	17708	264	16	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
Gel8	IPI00008433	22862	47	7 (47)	RPS5 40S ribosomal protein S5
Gel8	IPI00221088	22578	208	41	RPS9 40S ribosomal protein S9
Gel1	IPI00010204	19318	135	13 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
Gel8	IPI00010204	19318	80	13	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
Gel1	IPI00009797		47	1 (1)	TM7SF3 Transmembrane 7 superfamily member 3
Gel1	IPI00302133	82497	81	18	TRPV5
Gel5	IPI00302133	82497	1306	132	TRPV5
Gel8	IPI00302133	82497	244	32	TRPV5
Gel5	IPI00925667	43159	1306	130	TRPV5

Tabelle 22: Liste der durch ESI-Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den Pulldowns mit dem GST-Fusionsprotein C4 aus Plazentahomogenat. Das Molekulargewicht (MW) der Proteine ist in Da angegeben. Der Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Protein identifiziert wurde ist ab einem Wert von 36 signifikant (außer Gel 6: ab 35). Bei der Anzahl individuell gefundener Peptide geben Zahlen in Klammern an, wenn weniger als 3 einzelne Peptide signifikant sind. Proteine die fettrot geschrieben sind, werden in weiteren Versuchen untersucht. Blau hinterlegte Proteine: bekannte Interaktionspartner von TRPV5, die einmal identifiziert wurden.

Gel #	IPI-Nr.	MW Protein [Da]	Score	Anzahl individuell gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Protein Name
Gel4	IPI00939498	29329	36	7 (1)	-29 kDa protein
Gel4	IPI00007289	59482	403	14	ALPP Alkaline phosphatase, placental type
Gel2	IPI00002459	75229	83	8 (1)	ANXA6 annexin VI isoform 2
Gel4	IPI00002459	75229	305	24	ANXA6 annexin VI isoform 2
Gel6	IPI00002459	75229	61	7 (1)	ANXA6 annexin VI isoform 2
Gel7	IPI00002459	75229	225	4 (2)	ANXA6 annexin VI isoform 2
Gel2	IPI00739770		44	3 (1)	C2orf77 hypothetical protein LOC129881
Gel2	IPI00002547	74529	168	20	CAPN6 Calpain-6
Gel6	IPI00002547	74529	125	21	CAPN6 Calpain-6
Gel4	IPI00654755	15988	194	10	HBB Hemoglobin subunit beta
Gel4	IPI00220706	16130	167	10 (3)	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1
Gel4	IPI00007702	69978	49	5 (1)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2
Gel2	IPI00021304	65825	81	11 (1)	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
Gel6	IPI00021304	65825	220	25	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
Gel7	IPI00021304	65825	69	5 (1)	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
Gel7	IPI00376798	20240	110	8 (2)	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11
Gel4	IPI00215719	21621	161	5	RPL18 60S ribosomal protein L18
Gel6	IPI00215719	21621	168	8	RPL18 60S ribosomal protein L18
Gel7	IPI00215719	21621	190	4	RPL18 60S ribosomal protein L18
Gel6	IPI00247583	18553	75	5 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
Gel7	IPI00247583	18553	76	4 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
Gel7	IPI00021266	17684	77	2 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
Gel4	IPI00550021	46080	286	14	RPL3 60S ribosomal protein L3
Gel7	IPI00550021	46080	50	8	RPL3 60S ribosomal protein L3
Gel4	IPI00008433	22862	38	3 (1)	RPS5 40S ribosomal protein S5
Gel7	IPI00008433	22862	55	2 (1)	RPS5 40S ribosomal protein S5
Gel6	IPI00010204	19318	49	5 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
Gel7	IPI00010204	19318	51	8 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
Gel4	IPI00220194	54049	72	3 (1)	SLC2A1 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
Gel7	IPI00220194	54049	82	2 (1)	SLC2A1 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
Gel2	IPI00302133	82497	119	11 (1)	TRPV5
Gel4	IPI00302133	82497	215	21 (1)	TRPV5
Gel6	IPI00302133	82497	560	3	TRPV5
Gel7	IPI00302133	82497	195	13 (1)	TRPV5
Gel2	IPI00644712	69799	2477	112	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit1
Gel4	IPI00644712	69799	1792	94	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit1

Gel6	IPI00644712	69799	517	33	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit1
Gel4	IPI00219219	14706	41	2 (1)	LGALS1 Galectin-1
Gel4	IPI00385034	37391	57	3 (1)	SLC9A3R2 Isoform 1 of Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2

Tabelle 23: Liste der durch ESI-Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den Pulldowns mit dem GST-Fusionsprotein C4 aus Plazentamikrosomen. Das Molekulargewicht (MW) der gefundenen Proteine ist in Da angegeben, der Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Protein identifiziert wurde und ist ab einem Wert von 36 signifikant. Die Anzahl gefundener Peptide gibt an, wie viele individuelle Peptide gefunden wurden, die dem Protein zugeordnet werden können. Zahlen in Klammern sind geben an, wenn weniger als 3 einzelne Peptide signifikant sind. Proteine die fettrot geschrieben sind, werden in weiteren Versuchen eingesetzt.

Gel #	IPI-Nr.	MW Protein [Da]	Score	Anzahl individuell gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
Gel8	IPI00064350		38	1	C12orf52 Isoform 1 of Uncharacterized protein
Gel1	IPI00739770		38	3 (1)	C2orf77 hypothetical protein LOC129881
Gel1	IPI00002547	74529	180	23	CAPN6 Calpain-6
Gel8	IPI00002547	74529	252	20	CAPN6 Calpain-6
Gel1	IPI00220706	16130	40	1	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1
Gel1	IPI00012074	70899	822	66	HNRNPR Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
Gel8	IPI00012074	70899	132	7	HNRNPR Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
Gel1	IPI00003362	72377	63	9 (1)	HSPA5 HSPA5 protein
Gel5	IPI00003362	72377	87	10 (1)	HSPA5 HSPA5 protein
Gel1	IPI00935718	5660	39	1 (1)	LOC100293239; hypothetical protein
Gel8	IPI00935718	5660	49	1 (3)	LOC100293239; hypothetical protein
Gel5	IPI00008483	59644	236	20	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
Gel8	IPI00019502	226392	325	36	MYH9 Isoform 1 of Myosin-9
Gel1	IPI00376798	20240	83	4	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11
Gel1	IPI00413324	21383	62	7 (1)	RPL17 60S ribosomal protein L17
Gel1	IPI00247583	18553	39	4 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
Gel8	IPI00219153	14778	39	3 (1)	RPL22 60S ribosomal protein L22
Gel1	IPI00021266	17684	152	12	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
Gel8	IPI00021266	17684	96	1 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
Gel8	IPI00219155	15788	49	2 (1)	RPL27 60S ribosomal protein L27
Gel1	IPI00550021	46080	41	4 (2)	RPL3 60S ribosomal protein L3
Gel5	IPI00550021	46080	205	11	RPL3 60S ribosomal protein L3
Gel5	IPI00003918	47667	139	8	RPL4 60S ribosomal protein L4
Gel1	IPI00025091	18419	39	3 (1)	RPS11 40S ribosomal protein S11
Gel8	IPI00026271	16263	49	1 (1)	RPS14 40S ribosomal protein S14
Gel8	IPI00013296	17708	59	4 (1)	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
Gel1	IPI00010204	19318	314	34	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
Gel1	IPI00009797		46	1	TM7SF3 Transmembrane 7 superfamily member 3
Gel1	IPI00302133	82497	284	3	TRPV5
Gel5	IPI00302133	82497	416	21	TRPV5
Gel8	IPI00302133	82497	177	10	TRPV5

Gel1	IPI00644712	69799	50	8 (1)	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
Gel5	IPI00644712	69799	83	4 (1)	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
Gel8	IPI00644712	69799	52	2 (1)	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1

Beim Vergleich der vier Tabellen fällt auf, dass viele ribosomale Proteine (vor allem RP-L / RP-S) und DNA bindende Proteine wie Transkriptions- und Spleißfaktoren sowie zahlreiche Hitzeschockproteine (HSP) identifiziert werden. Während die DNA-bindenden und Hitzeschock-Proteine vorwiegend in den Ansätzen mit Plazentahomogenat (sowohl an TRPV5-N7 als auch an TRPV5-C4) gefunden werden, stammen die ribosomalen Proteine (z.B. RPL27/RPS4) eher aus den Ansätzen, in denen Mikrosomen (bei N7 und C4) verwendet werden. Alle in den Tabellen aufgeführten ribosomalen Proteine werden zwar nicht in GST Proben gefunden, allerdings werden in den GST Proben (siehe Anhang) einige andere Mitglieder dieser Proteinfamilie mit großer Häufigkeit gefunden, aber mehr in Proben von Plazentamikrosomen. Hitzeschockproteine konnten in GST Proben sowohl mit Plazentahomogenat als auch Mikrosomen identifiziert werden. Zu den weiteren identifizierten Proteinen zählen eine Hämoglobin-Untereinheit (HBG; Homogenatproben von N7 und C4), ein Zytoskelett-assoziiertes Protein (POTE E; Homogenatprobe von N7) sowie mitochondriale Proteine (z.B. Peroxiredoxin-5; in Homogenat- und Mikrosomenproben von N7). Epidermales Keratin wird in drei unabhängigen Versuchen als GST-TRPV5-C4 bindendes Protein nachgewiesen. Teile des TRPV5-Proteins werden mehrmals identifiziert, jedoch werden in den Ansätzen mit N7 nur N-terminale Peptide signifikant und umgekehrt bei C4 nur C-terminale Peptide signifikant identifiziert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass jeweils das eingesetzte Fusionsprotein selbst identifiziert wird und nicht gebundenes endogenes TRPV5 Protein aus der Plazenta. In der Negativkontrolle (GST), kann TRPV5 ebenfalls einmal nachgewiesen werden. NHERF2 und Galectin-1, von denen eine Interaktion mit TRPV5 schon von anderen Gruppen nachgewiesen wurde [Cha et al., 2008; Embark et al., 2004] werden im Ansatz mit TRPV5-C4 (Homogenat) als bindende Proteine nachgewiesen (Tabelle 22). Insgesamt werden sie aber nur einmal gefunden. Zu den Proteinen, die insgesamt am häufigsten gefunden werden, zählen Ku 70 (oder ATP-abhängige DNA Helikase 2 Untereinheit 1; Genname XRCC6) und Calpain-6 (Genname CAPN6). Ku70 wird zum Teil mit Scorewerten über 2000 identifiziert und sowohl von dem N- als auch dem C-terminalen Fusionsprotein gebunden. Die höchsten Scorewerte werden in den Ansätzen aus Plazentahomogenat sowohl von N7 als auch C4 erreicht. In den Proben von N7 mit

Plazentamikrosomen wird das Protein nicht gefunden, und bei den Pulldowns mit C4 aus Mikrosomen sind die Werte im Vergleich zum Homogenat wesentlich niedriger. Insgesamt wird Ku70 in zehn und Calpain-6 in sechs verschiedenen Ansätzen detektiert. Beide Proteine assoziieren sowohl mit dem C- und N-Terminus, aber bei N7 werden sie nur aus dem Homogenat und nicht aus den Mikrosomen isoliert. Am häufigsten werden sowohl Calpain-6 als auch Ku70 in den Ansätzen identifiziert, die mit dem C-Terminus (C4) von TRPV5 durchgeführt wurden. Ein weiteres Protein, welches in der Auswertung der Gesamtsuren zweimal nur bei N7 in Spuren mit Plazentahomogenat gefunden wird, ist das Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase Isozym 2 (oder 11 β -HSD2/ Gennname HSD11B2). Die drei Proteine Ku70, Calpain-6 und 11 β -HSD2 scheinen als mögliche Interaktionspartner von TRPV5 am viel versprechendsten, weshalb im weiteren Verlauf alle Banden, die aus den Gelen ausgeschnitten wurden, einzeln auf das Vorhandensein dieser drei Proteine untersucht werden. In Tabelle 24 sind getrennt nach N7 und C4 die Proteinbanden aufgelistet, in denen wenigstens eines der drei Proteine identifiziert wird. Zusätzlich ist angegeben, ob in der gleichen Bande auch das TRPV5 Protein identifiziert wird. Die entsprechenden Banden sind in den Gelen von Abb. 37 und Abb. 38 (rote Kästen) markiert.

Tabelle 24: Auflistung der Banden in denen in Pulldown-Experimenten mit den Fusionsproteinen N7 und C4 entweder das Protein Calpain-6, Ku70 oder 11 β HSD2 gefunden wurde. Aufgeführt sind sowohl Banden, der Gele mit Proben aus Plazentahomogenat (H) als auch Mikrosomen (M), die Banden sind in Abb. 37 + Abb. 38 eingezeichnet. Zusätzlich sind die Scorewerte des gefundenen Proteins und die Anzahl der identifizierten Proteine angegeben. Graue Schrift bedeutet, dass für diese Protein die Gesamtscore signifikant ist, aber kein Peptid einzeln oberhalb der Signifikanzschranke liegt. In der letzten Spalte wurde angegeben, ob TRPV5 in der gleichen Bande auch identifiziert wurde. +: das gefundene Peptid liegt N-terminal und ist spezifisch für TRPV5.

Fusionsprotein	Bandennr. (H oder M)	Protein	Score	Peptide (davon signifikant)	TRPV5 identifiziert? (Score/Peptide/signifikant)
[N7	2 (H)	Calpain-6	195	17 (0)	/]
N7	3 (H)	Ku70	989	41 (14)	/
		Calpain-6	123	8 (0)	
N7	7 (H)	Ku70	577	23 (8)	/
		Calpain-6	217	14 (2)	
N7	8 (H)	11 β -HSD2	456	17 (5)	ja (139/6/1)
N7	14 (H)	Ku70	879	32 (9)	/
		Calpain-6	49	2 (0)	
N7	15 (H)	Ku70	102	3 (2)	ja (112/4/1)
N7	16 (H)	11 β -HSD2	93	2 (1)	ja (220/9/3)
N7	18 (H)	Ku70	551	18 (5)	/

		Calpain-6	306	12 (3)	
N7	19 (H)	Calpain-6	236	10 (2)	/
N7	21 (M)	Ku70	36	1 (1)	ja (473/13/3)
[N7	22 (M)	Calpain-6	36	2 (0)	ja (142/10/2)]
C4	4 (H)	Ku70	686	22 (8)	ja (40/2/1)
		Calpain-6	484	19 (7)	
C4	5 (H)	Ku70	2295	88 (44)	ja (40/2/0)
C4	9 (H)	Ku70	2066	82 (35)	/
		Calpain-6	49	5 (0)	
C4	10 (H)	Ku70	124	11 (1)	/
C4	11 (H)	Calpain-6	306	16 (2)	/
		Ku70	57	2 (1)	
C4	12 (H)	Ku70	798	26 (8)	ja (127/2/1)
		Calpain-6	133	5 (3)	
C4	13 (H)	Ku70	40	1 (1)	/
C4	17 (H)	Calpain-6	236	10 (2)	/
C4	20 (M)	Calpain-6	133	8 (1)	/
		Ku70	120	7 (1)	
C4	23 (M)	Ku70	116	4 (1)	ja (198/6/1) ⁺
C4	24 (M)	Calpain-6	661	21 (9)	/
		Ku70	55	2 (1)	

Wie in Abb. 37 und Abb. 38 zu sehen ist, werden alle Proteine in Bereichen gefunden, die annähernd den Molekulargewichten der drei Proteine (Calpain-6: 74 kDa, Ku70: 70 kDa, 11 β HSD2: 44 kDa) entsprechen. Wie auch bei der Auswertung der gesamten Spuren schon beobachtet, werden die Proteine am häufigsten in den Ansätzen gefunden, die mit Plazentahomogenat durchgeführt wurden. 11 β -HSD2 wird zweimal in Ansätzen mit N7 im Homogenat identifiziert. Ebenfalls am häufigsten in Homogenat-Proben gefunden werden Calpain-6 und Ku70. Ku70 wird fünfmal im Homogenat bei N7 gefunden und sogar siebenmal bei C4 und hier auch mit den höchsten Scorewerten von 2295 und 2066. Obwohl die Proteine sich im Molekulargewicht um 5 kDa unterscheiden, werden sie bei N7 zweimal zusammen in der gleichen Bande (Bande 7 und 18, Tabelle 24) gefunden. Bei Pulldown-Versuchen mit C4 werden Ku70 und Calpain-6 fünfmal zusammen in einer Bande identifiziert (Banden 4, 11, 12, 20 und 24, Tabelle 24) wobei in zwei Banden zusätzlich noch das TRPV5 Fusionsprotein identifiziert wird. Bei den Plazentamikrosomen als

Ausgangsmaterial kann Ku70 bei N7 nur einmal identifiziert werden und Calpain-6 gar nicht, in C4-Ansätzen ist Ku70 dagegen dreimal vorhanden und auch Calpain-6 zweimal. Calpain-6 ist in beiden Fällen zusammen mit Ku70 in einer Bande identifiziert worden und in einer dieser beiden Ansätze wurde auch zusätzlich das TRPV5 Protein mit einem signifikanten Peptid gefunden. Dieses Peptid stammt jedoch nicht vom C-Terminus, sondern liegt im N-Terminus. Bei einer BLAST-Suche mit der Sequenz dieses N-terminalen Peptids wird eindeutig das humane TRPV5 Protein gefunden. In den Pulldown Ansätzen mit GST werden 11 β -HSD2 und Calpain-6 jeweils einmal mit signifikantem Gesamtscore identifiziert (Score 48 bzw. 43; signifikant ab 36, schwarze Kasten in Abb. 37 + Abb. 38), allerdings war keines der Peptide (2 für 11 β -HSD2 bzw. 3 für Calpain-6) einzeln signifikant, so dass das Protein nicht als identifiziert gilt. Diese experimentellen Daten alleine reichen allerdings nicht aus, um diese Proteine als neue Interaktionspartner von TRPV5 zu identifizieren. Dazu muss die Interaktion noch durch andere Methoden bestätigt werden.

4.5.2 Western-Blot Analyse der im Pulldown gefundenen putativen TRPV5

Interaktionspartner

Um eine mögliche Interaktion der im vorigen Abschnitt beschriebenen 3 Proteine weiter zu untersuchen, werden mit den zwei gleichen TRPV5 Fusionsproteinen N7 und C4 und GST erneut Pulldown-Experimente durchgeführt und nach Elution und SDS-PAGE die Gele für einen Western Blot eingesetzt. Als Ausgangsmaterial werden nur Plazentahomogenate und keine Mikrosomen eingesetzt, da in dem Homogenat alle drei Proteine am häufigsten identifiziert wurden. Die Western Blot Membranen werden dann sowohl mit einem Ku70, einem Calpain-6 und einem 11 β -HSD2-Antikörper inkubiert, um zu überprüfen, ob die Proteine mit Hilfe der Fusionsproteine aus der Plazenta isoliert wurden (Abb. 39). In der ersten Spur ist in allen drei Western Blots 10 μ l des Plazentahomogenats, das mit den Fusionsproteinen inkubiert wurde aufgetragen und mit den drei Antikörpern kann jeweils eine einzelne Bande nachgewiesen werden, die dem Molekulargewicht des jeweiligen Proteins entspricht, also 74 kDa für Calpain-6, 70 kDa für Ku70 und 44 kDa für 11 β -HSD2. In dem Western Blot, der mit dem Calpain-6 Antikörper entwickelt wurde, ist eine schwache Bande bei etwa 75 kDa in der Spur detektiert worden, in der das Eluat aufgetragen ist, welches von dem GST-Ansatz stammt. Wesentlich stärkere Signale sind in den Spuren zu erkennen, bei denen das Plazentahomogenat mit den Fusionsproteinen N7 bzw. C4 inkubiert war. Ein ähnliches Muster zeigt sich auch für Ku70. In der Spur, in der der Versuchsansatz mit dem GST-Protein aufgetragen wurde, ist zwar ein Signal bei einem Molekulargewicht von ca.

70 kDa zu erkennen, allerdings sind die Signale in den Spuren mit den Ansätzen der beiden TRPV5 Fusionsproteine wesentlich stärker, bei C4 sogar noch etwas mehr als bei N7. Mit dem 11 β -HSD2 Antikörper werden Banden bei einem Molekulargewicht von knapp unter 45 kDa identifiziert, mit einer kaum zu erkennenden Bande im GST Ansatz und einem deutlich stärkeren Signal bei dem N7-Ansatz. In der Spur mit dem C4 Fusionsprotein wird auch eine Bande detektiert, allerdings wesentlich schwächer als bei N7. Insgesamt kann im Western Blot gezeigt werden, dass alle drei Proteine in Plazentahomogenaten vorhanden sind und diese bei einem Pulldown-Experiment mit TRPV5-Fusionsproteinen verstärkt an die N- bzw. C-terminalen GST-TRPV5-Fusionsproteine binden, wohingegen eine Interaktion mit GST alleine so gut wie gar nicht zu detektieren ist.

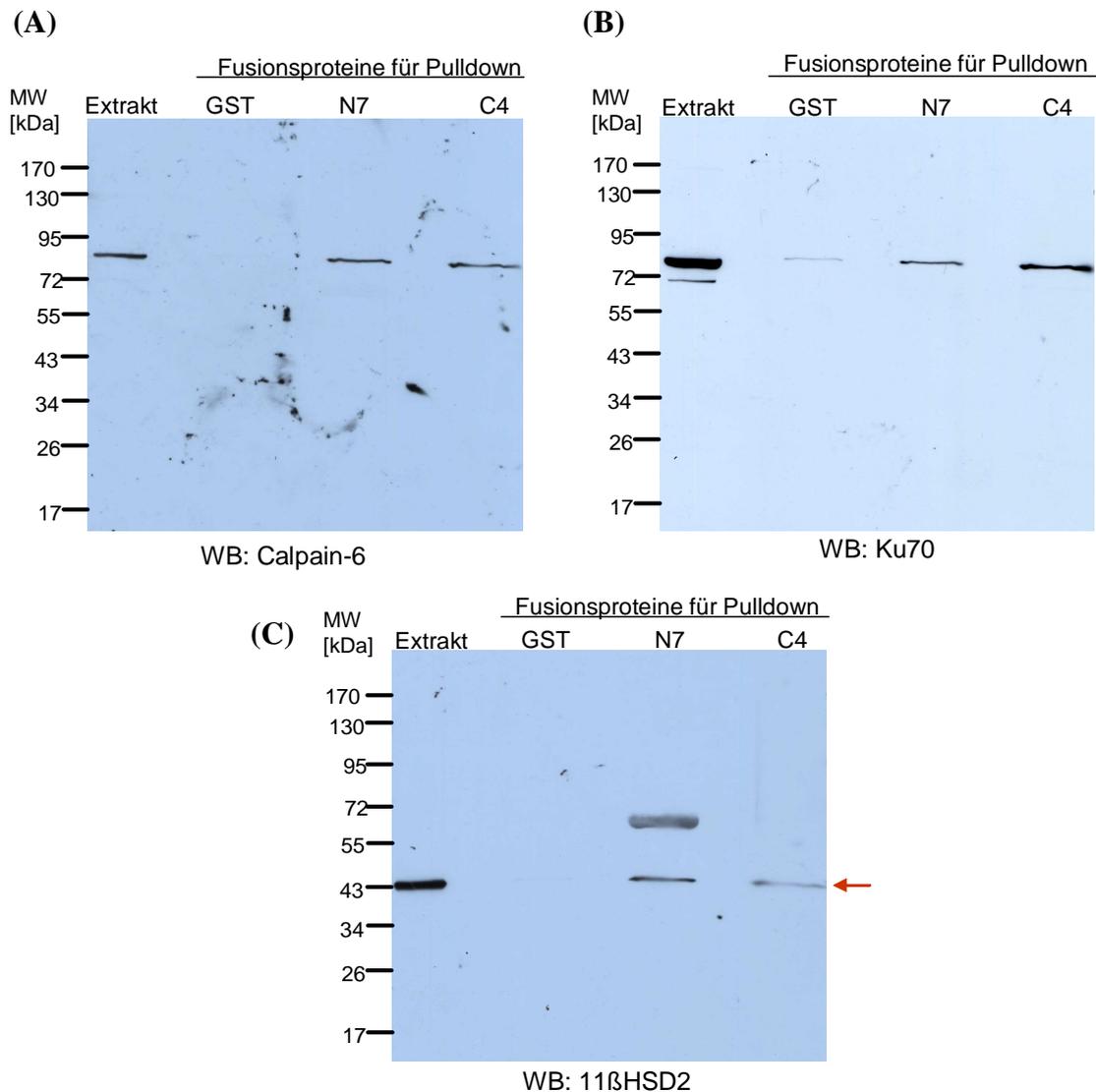


Abb. 39: Western Blots von Pulldown-Experimenten mit TRPV5 Fusionsproteinen.

Für den Pulldown wurde Plazentahomogenat verwendet und mit den Fusionsproteinen N7 und C4 sowie GST inkubiert. Die Eluate werden im SDS-Gel (10%) aufgetrennt und die gebundenen Proteine im WB analysiert. Vom verwendeten Homogenat (Extrakt) werden 10 μ l, die Eluate komplett aufgetragen. GST/N7/C4 bezeichnen jeweils das immobilisierte Protein, das für den Pulldown verwendet wurde. (A) Inkubation des WB mit dem Calpain-6 AK. (B) Inkubation des WB mit dem Ku70 AK. (C) Inkubation des WB mit dem 11 β -HSD2 AK.

5 Diskussion

Der TRPV5-Ionenkanal wurde ursprünglich in der Niere entdeckt. Mittlerweile ist seine Expression aber auch in anderen Geweben wie z.B. im Pankreas, dem Gehirn und der Plazenta nachgewiesen (siehe Einleitung). Da eine bedeutende Funktion des Kanals, zumindest in der Niere, der Kalziumtransport ist, liegt die Vermutung nahe, dass er in der Plazenta ähnliche Aufgaben übernimmt. Seine genaue Funktion in der Plazenta wurde allerdings noch nicht identifiziert. Die meisten Proteine liegen in der Zelle in zum Teil großen Multiprotein-Komplexen vor. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, Interaktionspartner von TRPV5 in der humanen Plazenta zu identifizieren. Dazu wurden zunächst Antikörper gegen das Protein hergestellt und charakterisiert, um mit Hilfe dieser den Kanal aus der Plazenta in einer TRPV5-Antikörper-Affinitätschromatographie anzureichern. Parallel dazu wurden GST-Fusionsproteine von TRPV5 kloniert und exprimiert, die danach sowohl zur Antikörper-Charakterisierung als auch für Pulldown-Experimente mit anschließender massenspektrometrischer Analyse verwendet wurden.

5.1 Beurteilung der Expression und Reinigung der GST-TRPV5 Fusionsproteine

Sowohl der N- als auch der C-Terminus des TRPV5 Proteins wurde einmal komplett, sowie kleinere Bereiche von beiden Teilen, kloniert. Insgesamt wurden sieben N-terminale und vier C-terminale GST-TRPV5 Fusionsproteine kloniert. In Testexpressionen mit den klonierten Plasmiden wurde gezeigt, dass sich alle Fusionsproteine annähernd mit dem errechneten theoretischen Molekulargewicht (Tabelle 14) exprimieren lassen. Bis auf die drei GST-TRPV5-Fusionsproteine N2, N4 und N6 konnten im Folgenden alle Fusionsproteine mit Ausbeuten zwischen 150 µg und 1500 µg über den GST-Affinitätstag aufgereinigt und anschließend von der Säule eluiert werden. Allerdings waren bei allen Proteinen zum Teil noch deutliche Mengen an nicht solubilisiertem Protein im Pellet vorhanden, das nach dem Aufschluss übrig blieb (3.2.2) und somit nicht weiter für die Aufreinigung eingesetzt werden konnten. Wahrscheinlich liegen die Proteine dort aggregiert in Einschlusskörperchen ("Inclusion bodies") vor (erstmal beschrieben 1972 von der Goldbergergruppe [Prouty et al., 1972]) und werden mit dem hier verwendeten Aufschlussverfahren nicht wieder in Lösung gebracht. Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, dass sich die Fusionsproteine N2, N4 und N6 trotz Expression nicht in messbaren Mengen aufreinigen ließen, oder bei den anderen Fusionsproteinen die Ausbeute zum Teil gering war. Durch Absenken der Inkubationstemperatur nach Induktion auf 29 °C sowie Glukose im LB-Medium wurde versucht, der Bildung von Einschlusskörperchen entgegen zu wirken, was für die meisten

Fusionsproteine erfolgreich war. Bei den drei nicht aufgereinigten Fusionsproteinen könnte man spezielle Protokolle zur Rückgewinnung von ausgefallenen Proteinen anwenden und so die Ausbeuten erhöhen [Fischer et al., 1993; Tao et al., 2010]. Eine Möglichkeit, um die Bildung von Einschlusskörperchen in *E.coli* zu verringern, ist die gleichzeitige Koexpression mit Chaperonen wie z.B. DnaK, wodurch der Anteil an löslichen Proteinen erhöht wird, da mehr Proteine gefaltet werden können [Blum et al., 1992]. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines alternativen Affinitätstags wie Thioredoxin [LaVallie et al., 1993]. Bei den aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteinen im Coomassie-Gel (Abb. 13) sind neben dem Volllängen-Fusionsprotein auch noch vereinzelte Abbauprodukte unterhalb der entsprechenden Proteinbanden vorhanden, die bis zur Größe des GST-Proteins reichen. Diese stammen entweder von Proteinen, die bei der Expression nicht in voller Länge hergestellt wurden, oder Proteinen, die während dem Aufreinigungsprozess proteolytisch degradiert wurden. Beim Aufschluss der Bakterien werden nicht nur die Fusionsproteine freigesetzt, sondern auch alle bakteriellen Proteine wie Proteasen. Trotz Verwendung von Proteaseinhibitoren und der Durchführung aller Arbeiten bei 4 °C ist es möglich, dass nicht alle Proteasen in ihrer Aktivität gehemmt wurden und deshalb Abbauprodukte entstehen, die kürzer als das eigentliche Fusionsprotein sind. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum das Fusionsprotein N5, das ein theoretisches Molekulargewicht von 38 kDa besitzt, im SDS-Gel nur eine Größe von weniger als 35 kDa aufweist (Abb. 13 B).

5.2 Validierung der Spezifität und Affinität von polyklonalen TRPV5 Antikörpern unter Verwendung verschiedener biochemischer Nachweisverfahren

Bisher gibt es erst wenige Nachweise von TRPV5 Proteinen in nativem Gewebe, sondern die meisten Ergebnisse zur Gewebeexpression sind nur durch mRNA-Transkripte nachgewiesen. Die Ursache dafür könnte damit zu begründensein, dass in Analogie zu anderen TRP-Kanälen TRPV5 in der Zelle auch niedrig exprimiert ist. In funktionellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass etwa 15 CRAC-Kanäle (calcium release activated channel) pro inaktiver Immunzelle vorliegen [Fomina et al., 2003]. Schätzungen für spannungsabhängige Kalziumkanäle in Kardiomyozyten zeigen, dass ca. 3000 Kopien exprimiert werden, was ca. 20 Femtomol Protein pro Milligramm Gesamtprotein im Homogenat von Herzwegen entspricht [Ruth et al., 1985]. Spezifische und hochaffine Antikörper gegen ein Protein sind nicht nur unerlässlich für genaue Untersuchungen der Expression der entsprechenden Proteine in nativem Gewebe, sondern auch ein hilfreiches Werkzeug auf der Suche nach neuen

Interaktionspartnern. In dieser Arbeit konnten durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden vier TRPV5-spezifische polyklonale Antikörper hergestellt werden, die zum Nachweis des TRPV5 Proteins mit Hilfe von Western Blots, Immunhistochemie und Immunpräzipitation ausgetestet wurden. Für die Immunisierung wurden Peptide ausgewählt, die eine Länge von 15-16 Aminosäuren haben. Zur Generierung von Antikörpern, welche das Originalprotein noch erkennen, sollten synthetisch hergestellte Peptide mindestens eine Länge von sechs Aminosäuren besitzen, wobei dann die Qualität der gebildeten Antikörper relativ variabel ist. Sollen diese Antikörper aber auch das native Protein erkennen, werden längere Sequenzen empfohlen [Harlow et al., 1988]. Mit der ausgewählten Peptidlänge wurden in dieser Arbeit Antikörper generiert, die für die meisten Techniken gut eingesetzt werden können.

5.2.1 Die Spezifität des TRPV5 Antikörper 982/3 und der Vergleich mit einem kommerziellen TRPV5 Antikörper

Der Antikörper 982/3, der gegen den absoluten C-Terminus des humanen TRPV5 Proteins gerichtet ist (AS 715-729), kann für die meisten untersuchten Methoden erfolgreich eingesetzt werden und zeigt im Western Blot von allen getesteten Antikörpern das beste Signal/Rausch-Verhältnis. Der TRPV5 Antikörper erkennt spezifisch im Western Blot das heterolog exprimierte murine TRPV5 Protein (transfizierte HEK-Zellen) und auch das endogen exprimierte humane TRPV5 Protein in der Plazenta. Ein Vergleich der RNA-Level von Niere, Dünndarm und Plazenta ergab, dass in der Plazenta die geringsten Mengen detektiert werden [Hoenderop et al., 2001b]. Die Spezifität des Antikörpers 982/3 für TRPV5 wird auf verschiedene Weise gezeigt. Zum einen liefern nur die Antikörper-Seren, nicht aber das Präimmunserum entsprechende Signale in ELISA Tests (Abb. 15) und Western Blot Analysen (Abb. 16). Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass TRPV6 in transfizierten COS-Zellen nur mit einem TRPV6 Antikörper erkannt wird und die TRPV5 Antikörper das TRPV6 Protein in keinem Fall erkennen. Innerhalb des gewählten TRPV5-Peptids sind nur 2 von 15 Aminosäuren zur TRPV6-Sequenz identisch, aber insgesamt sind beide Proteine auf Aminosäure-Ebene zu 75% homolog [Hoenderop et al., 2001b]. Der Antikörper erkennt in TRPV5 transfizierten HEK-Zellen die gleichen Signale wie der kommerzielle Antikörper der Firma Alomone. Die selbst hergestellten Antikörper scheinen jedoch eine höhere Affinität zu besitzen, als der kommerzielle Antikörper, da dieser das TRPV5 Protein zwar nach heterologer Überexpression (transfizierte Zellen) erkennt, nicht aber in den humanen Plazentamikrosomen (natives Gewebe) nachweist. Für die Generierung der beiden

verglichenen Antikörper sollte die Sequenz der Peptide identisch sein und beide sollten identische Epitope erkennen. Eine mögliche Erklärung, worauf die Unterschiede in der Affinität begründet sein könnten, wurde mit den Peptidblot-Versuchen gezeigt (Abb. 17). Für den kommerziellen Antikörper sind die Intensitäten der drei Peptidspots, die die Sequenz des immunogenen Peptids repräsentieren, identisch. Der Antikörper 982/3 bindet am stärksten an den letzten Spot (AS 720-729) und weniger stark an die beiden anderen Peptide (AS 711-720 bzw. 716-725). Dies zeigt, dass die Seren unterschiedliche Mengen an verschiedenen Antikörpern enthalten, die gegen das jeweilige Epitop gerichtet sind. Da das Peptid zur Immunisierung aber identisch war, ist diese unterschiedliche Affinität eventuell auf die Verwendung eines anderen Trägermoleküls bei der Kopplung des Peptids zur Immunisierung oder auch die Verwendung unterschiedlicher Kaninchenarten zurückzuführen. Sowohl mit dem selbst hergestellten als auch mit dem kommerziellen Antikörper war es nicht möglich, das TRPV5 Protein in Gewebelysaten oder verschiedenen Rattengewebe nachzuweisen. Die Menge an exprimiertem Protein scheint wie beschrieben zu gering zu sein, um das Protein ohne Anreicherung nachzuweisen. Dies gilt sowohl für die Niere, in der die Expression von TRPV5 am stärksten sein soll und entsprechend für die Plazenta, in der die Expression, zumindest auf RNA-Ebene im Vergleich zur Niere und auch innerhalb der Plazenta im Vergleich zu TRPV6, wesentlich geringer ist. [Moreau et al., 2002b; Peng et al., 2001]. Dass TRPV5 in Membranfraktionen aus Rattengewebe nicht zu detektieren ist, liegt möglicherweise daran, dass nicht die Proteinmenge zu niedrig ist, sondern dass aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen Mensch und Ratte (für Antikörper 982: nur 11 von 15 AS identisch) das Protein nicht erkannt wird.

5.2.2 Die vier TRPV5-Antikörper detektieren spezifisch das humane TRPV5 Protein

Für den Antikörper 982/3 sowie für die drei weiteren Antikörper 1052, 1074 und 1075 konnte gezeigt werden, dass sie spezifisch nur das GST-TRPV5 Fusionsprotein erkennen, in dem auch das Peptid-Epitop liegt (Abb. 21). Andere Fusionsproteine oder das GST-Protein alleine wurden nicht erkannt. Interessanterweise wurden bei dem Fusionsprotein C3 mit den C-terminalen Peptid-Antikörpern neben der 33 kDa Proteinbande noch weitere Banden in einem Größenbereich von 60-100 kDa detektiert (Abb. 21). Eine unspezifische Bindung der Antikörper an endogene Bakterienproteine ist unwahrscheinlich, da sowohl der Antikörper 982/3 als auch der Antikörper 1052 unabhängig voneinander die gleichen Banden detektieren. Eine denkbare Erklärung wäre, dass es sich um multimere C3-Fusionsproteine handelt, die nicht vollständig denaturiert sind und der Antikörper diese bei einem höheren

Molekulargewicht spezifisch detektiert. Eine Assemblierung von TRPV5 Proteinen zu Homotetrameren, bzw. zu Heterotetrameren mit TRPV6, wurde zumindest bei Koexpression in Oocyten nachgewiesen [Hoenderop et al., 2003c]. Die Interaktion der Proteine beruht dabei sowohl auf Resten im N- als auch dem C-Terminus [Hellwig et al., 2005], wobei für TRPV5 das Ankyrin-Motiv 1 (Aminosäuren 64-76) sowie die C-terminalen Reste 596-601 als potentielle Interaktionsdomänen identifiziert wurden [Chang et al., 2004]. Diese Sequenzen liegen beide nicht innerhalb des C3 Fusionsproteins, aber es ist durchaus denkbar, dass auch andere bisher noch nicht gezeigte Regionen des TRPV5 Proteins miteinander interagieren, über die eine Homooligomerbildung erfolgt. Ein anderes Phänomen, das bei bakteriell exprimierten Proteinen häufiger Auftritt, ist eine Interaktion der heterolog exprimierten Fusionsproteine mit Chaperonen der bakteriellen Faltungsmaschinerie (z.B. DnaK, 70 kDa), die so stark ist, dass sie sich durch eine Denaturierung in SDS-Ladepuffer nicht komplett auflösen lässt [Georgopoulos, 2006; Kerner et al., 2005].

In Western Blot Analysen mit allen vier TRPV5 Antikörpern (982/3, 1052, 1074, 1075) auf Plazentamikrosomen wurden jeweils zwei Banden nachgewiesen, die von ihren Molekulargewichten zu der nicht-glykosylierten (~83 kDa) und der glykosylierten Form (90-100 kDa) des TRPV5 Proteins passen (Abb. 21). Da mit allen Antikörpern, die jeweils unterschiedliche Epitope erkennen, immer das gleiche Bandenmuster bei 80-100 kDa erkannt wird, ist davon auszugehen, dass spezifisch TRPV5 Proteine detektiert werden. Einen Hinweis, dass es sich tatsächlich um die glykosylierte Form von TRPV5 handelt, liefert das Deglykosylierungsexperiment mit transfizierten HEK-Zellen (Abb. 30). Dabei wurde in einem Fall das Verschwinden der oberen Proteinbande nachgewiesen. Eine direkte Deglykosylierung von TRPV5 in Plazentamikrosomen war nicht erfolgreich, da das Protein vermutlich degradiert wurde und nach der Inkubationszeit mit der Deglykosidase im Western Blot nicht mehr zu detektieren war. Das TRPV5 Protein besitzt eine nachgewiesene N-Glykosylierungsstelle am Aminosäuren-Rest N358, zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne [Hoenderop et al., 2003c], die das Molekulargewicht durch ein Zuckergerüst vom komplexen Typ auf bis zu 100 kDa erhöht [Hoenderop et al., 2003c]. Für N-Glykosylierungen ist gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung, bei zellulären Transportvorgängen und bei der Kanalaktivität spielen [Helenius et al., 2001]. Dass diese Glykosylierung einen Einfluss auf die Regulation des TRPV5-Kalziumkanals hat, zeigen Studien, die im Zusammenhang mit dem Proteohormon Klotho, in der Niere durchgeführt wurden [Cha et al., 2008; Chang et al., 2005; Lu et al., 2008]. Die extrazelluläre

Domäne von Klotho kann abgespalten werden und besitzt dadurch eine β -Glucuronidaseaktivität. Mit Hilfe dieser werden endständige Sialinsäuren vom komplexen Glykangerüst von TRPV5 abgespalten und dadurch die Bindung des Lektins Galectin-1 an darunter liegende N-Acetyllaktosaminreste ermöglicht [Cha et al., 2008]. Eine Bindung von TRPV5 an das Galectin-1-Netzwerk führt infolge dessen zu einer Akkumulation von funktionellen TRPV5-Kanälen in der Plasmamembran, wodurch eine erhöhte Kanalaktivität messbar ist (Abb. 40). Dieser Mechanismus beschreibt eine neue Form der Aktivierung von Ionenkanälen. Der aktivitätssteigernde Effekt durch die Glucuronidaseaktivität von Klotho konnte zwar auch für den verwandten TRPV6-Kanal nachgewiesen werden, bei dem diese Glykosylierungsstelle ebenfalls konserviert ist, aber nicht für die beiden Kanäle TRPV4 und TRPM6, die wie TRPV5 im distalen Bereich der Niere exprimiert werden [Lu et al., 2008]. Trotzdem ist beim TRPV4-Kanal die N-Glykosylierung am Einbau des Kanals in die Plasmamembran (trafficking) beteiligt [Xu et al., 2006]. Zusätzlich zu den TRP Kanälen wurde auch bei dem spannungsregulierten Kaliumkanal Kv1.4 die Stabilität und Zelloberflächenexpression durch Glykosylierung erhöht [Watanabe et al., 2004]. Im Falle des Kaliumkanals ROMK1 (renal outer medullary potassium channel 1) konnte gezeigt werden, dass durch die N-Glykosylierung die offene Konformation stabilisiert wird [Schwalbe et al., 1995]. Ebenso wird die Stabilität sowie die Plasmamembranexpression des Shaker-Kaliumkanals erhöht [Khanna et al., 2001].

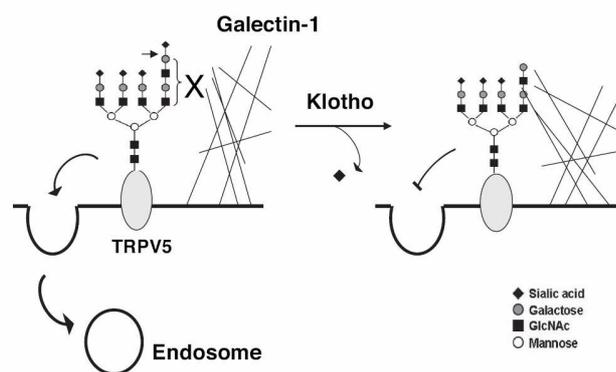


Abb. 40: Modell zur Regulation der Zelloberflächenretention von TRPV5 durch Klotho.

Die sezernierte Domäne von Klotho mit β -Glucuronidaseaktivität spaltet die endständigen Sialinsäuren des Glykangerüsts von TRPV5 ab, wodurch darunterliegende N-Acetyllaktosamin-Reste exponiert werden. Die Bindung an das Galectin-1 Netzwerk auf der extrazellulären Oberfläche bewirkt eine Akkumulation von funktionellen TRPV5 Kanälen an der Plasmamembran. [Cha et al., 2008]

Neben dem glykosylierten und unglykosylierten TRPV5 Protein werden in den Plazentamikrosomen zum Teil noch unspezifische Proteine bei kleineren Molekulargewichten detektiert (Abb. 21), was aber bei der Verwendung polyklonaler Antikörper auf komplexen Proteingemischen öfter auftritt. Entweder besitzen die erkannten Proteine ähnliche Sequenzen wie das antigene TRPV5-Peptid, oder bei der Affinitätsreinigung haben vereinzelte Antikörper aus dem Kaninchenserum unspezifisch an das Chromatographie-Säulenmaterial gebunden, welche durch die Waschschritte nicht entfernt werden konnten und wurden so nach der Elution weiter mitgeführt.

5.2.3 Untersuchung der TRPV5 Expression in Maus-Niere und humaner Plazenta sowie Hypothesen zur möglichen Funktionsrelevanz in der Plazenta

Beim Einsatz der Antikörper für die Immunhistochemie auf Kryoschnitten von Maus-Nieren, wurde mit einer weiteren Methode die Spezifität der Antikörper für TRPV5 untersucht. In den Schnitten (Abb. 23) wurden speziell Bereiche im späten distalen Tubulus (DCT2) und zum Teil auch im Verbindungstubulus (CNT, Bilder nicht gezeigt) angefärbt. TRPV5 wurde auf der luminalen Seite des DCT2 Segments vor allem in der Membran gefunden und im CNT zusätzlich auch noch schwach im Zytoplasma, was exakt mit den bisher beschriebenen Expressionsorten von TRPV5 im distalen Konvolut (DCT2) und dem Verbindungstubulus (CNT) in der Niere übereinstimmt [den Dekker et al., 2005; Hoenderop et al., 2000; Loffing et al., 2001]. Über das ganze Nephron verteilt, vom proximalen Tubulus mit einem Anteil von 70%, über die Henle-Schleife (15-20%) bis hin zum distalen Konvolut und Verbindungstubulus (15%), erfolgt die Kalziumresorption aus dem Primärharn [Hoenderop et al., 2005]. Während 85-90% der Resorption in den beiden ersten Teilen passiv erfolgt und es dort auch keinen Hinweis auf das Vorhandensein der typischen kalziumtransportierenden Proteine wie TRPV5/6, Calbindine, NCX1 oder PMCA1b gibt [Hoenderop et al., 2000; Loffing et al., 2001], erfolgt die Aufnahme von Kalzium im letzten Abschnitt ausschließlich über die genannten Transporter und Kalziumkanäle, wobei auf der luminalen Seite dafür vorwiegend TRPV5 verantwortlich ist [Hoenderop et al., 2003a]. Der Antikörper 982/3 detektiert das TRPV5 Protein am spezifischsten in der Maus-Niere, während der Antikörper 1075 gar nicht zum spezifischen Nachweis von des TRPV5 Proteins in Maus-Nieren geeignet ist. Möglicherweise spielt hier der Unterschied zwischen der menschlichen und der murinen Aminosäure-Sequenz eine Rolle, da bei dem antigenen Peptid nur 9 von 15 Aminosäuren identisch sind. Mit den Nieren-Schnitten konnte gezeigt werden, dass die Antikörper zur

Immundetektion von TRPV5 in Kryoschnitten geeignet sind und die angefärbten Bereiche mit den in der Literatur beschriebenen Expressionsorten von TRPV5 übereinstimmen. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass die Antikörper, die ursprünglich gegen das humane TRPV5 Protein gerichtet wurden, ebenfalls zum Nachweis des TRPV5 Proteins im humanen Plazentagewebe geeignet sind. Für Antikörper 1052, der die stärksten spezifische Signale in den Schnitten zeigt, aber auch mit den beiden Antikörpern 982/3 und 1074 werden vor allem Bereiche im Synzytiotrophoblast (STB) angefärbt (Abb. 24-Abb. 27). Hierbei fällt auf, dass die Lokalisation des TRPV5 Proteins nur wenig auf den apikalen Bereich beschränkt ist wie in der Niere, sondern die Antikörper-Signale fast gleichmäßig auch im Zytoplasma und sogar in der Basolateralmembran zu finden sind. Eine ähnliche Verteilung wie in dieser Arbeit für TRPV5 gezeigt, wurde von Bernucci und Mitarbeitern [Bernucci et al., 2006] in der Plazenta gefunden, die nicht nur für TRPV5 sondern auch für TRPV6 eine apikale und basolaterale Lokalisation im humanen Synzytiotrophoblasten beschreiben. Prinzipiell widerspricht eine solche Verteilung der klassischen Polarisierung von Epithelien wie zum Beispiel im proximalen Tubulus in der Niere, bei der die Kanäle zur Aufrechterhaltung eines gerichteten Transports nur auf einer Seite des Epithels vorhanden sind. Jedoch wurde auch die Plasmamembran-Kalzium-ATPase 1b (PMCA1b), die in der Niere und in der Plazenta für die Ausschleusung von Ca^{2+} über die Basolateralmembran verantwortlich ist, im Synzytiotrophoblasten zusätzlich in der Apikalmembran gefunden [Marin et al., 2008]. Analog der Koexpression im STB der Plazenta sind auch in der (Maus-)Niere TRPV5 und die PMCA1b in den gleichen Bereichen exprimiert [Loffing et al., 2001]. Ein "umgekehrtes" Verteilungsmuster in Bezug auf die Membranen wie für PMCA1b und TRPV5 existiert für die Na^+/K^+ -ATPase in der Plazenta, die in anderen Epithelien an der basolateralen Membran lokalisiert ist und aktiv Natrium im Austausch gegen Kalium aus der Zelle transportiert [Clarson et al., 1996]. Entgegen den Erwartungen ist aber sowohl die Expression als auch die Aktivität dieser ATPase in der mikrovillösen Apikalmembran zweifach höher, als auf der basolateralen Seite des Synzytiotrophoblasten [Johansson et al., 2000]. Die meisten Epithelien haben entweder nur eine sekretorische oder eine absorbierende Funktion zur gleichen Zeit [Sibley, 2009]; der Synzytiotrophoblast allerdings muss beide Funktionen parallel ausüben, um den Nährstofftransport zum Fötus und den Rücktransport von Abfallprodukten zur Mutter gleichzeitig zu bewerkstelligen. Diese Tatsache, und die Notwendigkeit, die eigene zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten, mögen zu dieser ungewöhnlichen Verteilung führen, so dass für Kalzium nicht nur ein unidirektionaler Weg für den Kalziumtransport von der Mutter zum Kind sondern auch der umgekehrte Weg besteht. Nach dem beschriebenen Prinzip in

polarisierten Geweben (siehe Einleitung), nach dem Kalzium auf der apikalen Seite entlang des elektrochemischen Gradienten passiv durch die entsprechenden TRP-Kanäle in die Zelle eintritt und mit Hilfe Kalzium-bindender Proteine zur Basolateralmembran gebracht wird, wo das Kalzium auf aktivem Weg entgegen des Konzentrationsgefälles auf der basolateralen Seite die Zelle verlässt, können die energieunabhängigen Kalziumkanäle in der basolateralen Membran aber nicht am Kalziumaustritt beteiligt sein. Auch wenn man bedenkt, dass die Kalziumkonzentration im Blut des Fötus höher ist, als die im Blut der Mutter, könnten diese Kalziumkanäle bei gleicher Funktion wie in der Apikalmembran fatale Folgen haben. Aus diesem Grund postulieren Bernucci et al. [Bernucci et al., 2006], dass es für das Vorhandensein von Kalziumkanälen in der Plazenta andere Funktionen als den Ionentransport geben muss. Möglicherweise sind diese Ionenkanäle an der Hormonsekretion des STB beteiligt. Der STB ist während der Schwangerschaft für die Produktion der schwangerschafts-assoziierten Hormone wie humanes Choriongonadotropin (hCG), humanes Chorionsomatotropin (hCS) und Östrogenen verantwortlich [Malassine et al., 2002]. Von den genannten Hormonen, ist hCG, ein heterodimeres Glykoprotein (aus $\alpha + \beta$ -Untereinheit), vor allem in den ersten sechs Wochen nach der Befruchtung zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft verantwortlich, indem es die Funktion des Gelbkörperchens (Corpus luteum) zur Produktion von Östrogenen und Progesteron unterstützt. In der reifen Plazenta nimmt die Expression zwar ab, ist aber verstärkt im STB lokalisiert [Kovalevskaya et al., 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass das hCG dort an der Differenzierung/Verschmelzung von Zytotrophoblasten zum Synzytiotrophoblasten durch Aktivierung eines cAMP-Proteinkinase Signalwegs essentiell beteiligt ist [Keryer et al., 1998; Shi et al., 1993]. Ähnlich wie in den Plazentaschnitten mit den TRPV5 Antikörpern beobachtet, führten Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von TRPV5 mit GFP (grün fluoreszierendes Protein)-getaggtten Proteinen auch nicht zu einer distinkten plasmamembranären Lokalisation. Vielmehr wurde festgestellt, dass TRPV5 Proteine vorrangig in intrazellulären Vesikeln lokalisiert sind und der Transport dieser Vesikel zur Zellmembran stark vom extrazellulären pH-Wert abhängig ist [Lambers et al., 2007]. Eine Alkalisierung (pH 8,5) bewirkt eine Erhöhung von TRPV5-vermittelten Strömen im Überexpressionssystem und eine Ansäuerung lässt diese schnell wieder verschwinden. Durch die Ansäuerung werden in einem unbekanntem Mechanismus die TRPV5-enthaltenden Vesikel zur Membran gebracht und fusionieren mit ihr, zerfallen jedoch nicht, so dass sie rasch wieder aus der Membran entfernt werden können. Die Lokalisation von TRPV5 in der Plasmamembran ist demnach hochdynamisch. Van de Graaf et al. [2008] haben entsprechend dazu Mechanismen zur Endozytose von TRPV5

identifiziert. Die Kanäle werden durch Dynamin- und Clathrin-abhängige Prozesse internalisiert und erscheinen erst in zahlreichen kleineren Vesikeln in der Zelle, die dann mit größeren verschmelzen. Dort sind die Kanäle mit Rab11a, einem Marker für Recycling-Endosomen, kolokalisiert. Nur ein geringer Teil des TRPV5 Proteins wird degradiert, während der größte Teil der internalisierten TRPV5-Kanäle den Recycling-Weg durchläuft und durch die direkte Interaktion mit Rab11a wieder zur Plasmamembran gelangen kann (Abb. 41).

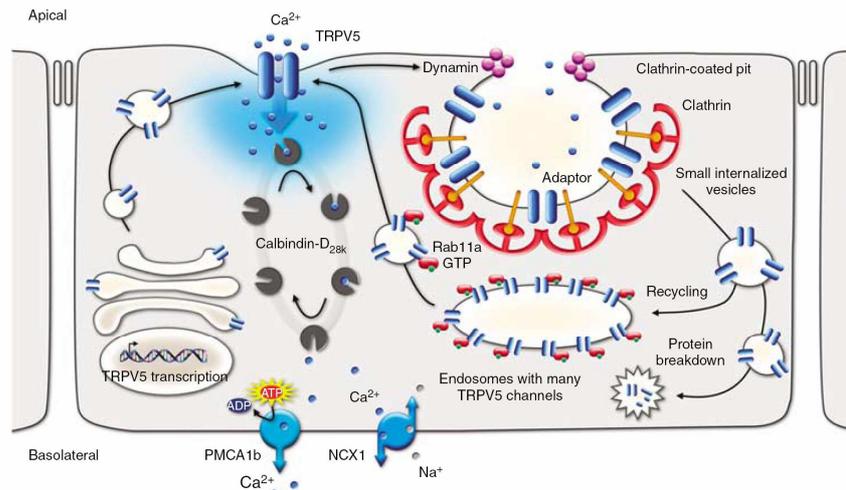


Abb. 41: Internalisierung von TRPV5-Kanälen in Endosomen.

In einem Dynamin- und Clathrin-abhängigen Prozess werden die Vesikel mit den TRPV5-Kanälen von der Plasmamembran abgeschnürt und sind in der Zelle erst in kleinen Vesikeln zu finden. Von diesen wird nur ein geringer Teil degradiert, der größte Teil verschmilzt mit größeren Vesikeln zu Endosomen. Aus diesen Endosomen können aktive TRPV5-Kanäle schnell wieder zur Plasmamembran transportiert werden, wo sie dann wieder Kalzium aufnehmen können. [de Groot et al., 2008]

Bei der Anfärbung der Schnitte mit den TRPV5 Antikörpern traten des Öfteren, aber nicht immer, unspezifische Signale im Bereich der Endothelzellen von Blutgefäßen auf (Abb. 25, AK 1052). Dieses Phänomen ist auch schon für andere Proteine in der Plazenta, die eigentlich nicht in Endothelzellen exprimiert sind (wie z.B. Dysferlin), in Zusammenhang mit Immunfärbungen beschrieben worden. Dysferlin ist ein 230 kDa Transmembranprotein, das an der Reparatur zerstörter Plasmamembranen in Skelettmuskelfasern beteiligt ist [Lennon et al., 2003; Vandre et al., 2007]. In der Plazenta ist es ähnlich wie TRPV5 im STB lokalisiert, allerdings ist seine Rolle in der Plazenta bis jetzt noch unbekannt.

5.3 Vergleichende Betrachtung der Identifikation von TRPV5 interagierenden Proteinen mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und Pulldown-Assays

5.3.1 Die Eignung von Triton X-100 zur Solubilisierung von TRPV5 Proteinen

Der TRPV5-Ionenkanal besitzt sechs Transmembrandomänen und liegt in Zellen integriert in Membranen vor. Um Membranproteine untersuchen zu können, müssen diese erst in Lösung gebracht, d.h. solubilisiert, werden. Da die hydrophoben Bereiche dabei in der wässrigen Umgebung des Puffers aggregieren würden, verwendet man zusätzlich Detergenzien, die mit ihrer amphiphilen Eigenschaft die hydrophoben Bereiche des Proteins umschließen und sie über ihre hydrophilen Bereiche in wässriger Lösung stabilisieren. Detergenzien besitzen unterschiedliche chemische Strukturen (Steroid-Gerüst, Alkyl- oder Phenyl-Reste) und damit auch unterschiedliche Eigenschaften bei der Solubilisierung von Membranproteinen [Rehm, 2006]. Zur Solubilisierung von TRPV5 Proteinen als Vorbereitung einer Immunpräzipitation, wurden deshalb mehrere Detergenzien ausgetestet. RIPA-Puffer, der mit Detergenzien wie SDS (ionisch), Nonidet-P40 (nicht ionisch) und Natriumdeoxychololat (ionisch) vorwiegend ionische Detergenzien enthält, ist nicht für die Solubilisierung von TRPV5 geeignet, da weder mit verschiedenen Antikörpern noch aus unterschiedlichen Geweben TRPV5 immunpräzipitiert werden kann (Tabelle 18). Mit Natriumdeoxychololat als Detergenz zur Solubilisierung wurden ebenfalls Immunpräzipitationen durchgeführt (nicht gezeigt), aber auch hier konnte TRPV5 aus der Plazenta nicht angereichert werden, obwohl dieses Detergenz im Allgemeinen sehr gut zur Isolation von Membranproteinen geeignet ist und 70-80% der Proteine in Lösung bringt [Rehm, 2006]. Allerdings ist auch bekannt, dass Natriumdeoxychololat die Konformation von Proteinen ändert und die Antikörper eventuell aus diesem Grund die Proteine nicht mehr binden können. Beim Austesten weiterer nichtionischer Detergenzien sowie CHAPS als zwitterionisches Detergenz (Tabelle 9), konnte nur nach Solubilisierung mit Triton X-100 das TRPV5 Protein aus der Plazenta präzipitiert werden. Obwohl TRPV6 stark homolog zu TRPV5 ist, vor allem in den Transmembranregionen, kann das TRPV6 Protein annähernd mit allen verwendeten Detergenzien solubilisiert werden. Man kann also nicht von der Struktur, in der sich die beiden Proteine vermutlich sehr ähnlich sind, auf das optimale Detergenz zur Solubilisierung schließen, sondern dieses muss für jedes Protein empirisch ermittelt werden. Die Solubilisierung mit einem Detergenz wie Triton X-100 bietet Vorteile zur Isolierung möglichst intakter Proteinkomplexe, da es als nichtionisches Detergenz Proteine weniger denaturiert und zudem Protein-Protein-Wechselwirkungen weniger beeinflusst werden, als bei ionischen Detergenzien.

5.3.2 Immunpräzipitation mit TRPV5 Antikörpern

Für die Inkubationszeit der IP wurde eine Dauer von zwei Stunden und nicht wie normalerweise über Nacht, als optimal ermittelt. Bei einer verlängerten Inkubation ist es möglich, dass das Protein degradiert wird, unter Umständen sogar durch noch im Solubilisat der Plazenta enthaltene Proteasen, welche nicht ausreichend von den Proteaseinhibitoren inaktiviert werden. Zum Teil ist auch die Halbwertszeit der Inhibitoren gering (für PMSF etwa 50 Minuten unter den gewählten Bedingungen), so dass eine kürzere Inkubation vorteilhaft ist. Entsprechend ist eine starke Degradation des TRPV5 Proteins, wie schon zuvor bei der Inkubation zur Deglykosylierung erwähnt, beobachtet worden, was vermuten lässt, dass das Protein insgesamt über längere Zeit außerhalb der natürlichen Umgebung instabil ist. Überraschenderweise ist nur der Antikörper 982/3 und vor allem das 9.Serum in der Lage TRPV5 zu präzipitieren. Eventuell erkennen die anderen Antikörper (1052, 1074 und 1075) die native Struktur von TRPV5 nicht, da für die Immunisierung nur kurze Peptide verwendet wurden, die meist nicht in der Lage sind, eine native Faltung wie z.B. Sekundär- und Tertiärstrukturen einzunehmen. Da die Peptide synthetisch hergestellt wurden, sind auch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen an diesen Peptiden nicht vorhanden. Das humane TRPV5 besitzt z.B. 14 putative Phosphorylierungsstellen sowohl im N- als auch C-Terminus für verschiedene Kinasen [den Dekker et al., 2003]. So wurden innerhalb der Sequenzen (siehe Tabelle 16) für die Peptide 1052 (an S698), 1074 (an S298) und 1075 (an S654) putative Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C identifiziert [den Dekker et al., 2003], für welche zum Teil auch schon ein Einfluss auf den TRPV5 Kanal gezeigt wurde (S298 und S654) [Gkika et al., 2006a], aber innerhalb der Sequenz des Peptids 982 liegt keine PKC-Phosphorylierungsstelle. Die Antikörper werden unter Umständen gegen Epitope gebildet, die im nativen Protein so nicht vorliegen, oder durch ihre native Faltung nicht an der Proteinoberfläche liegen und damit nicht für die Antikörper zugänglich sind. Denkbar wäre auch, dass die entsprechenden Epitope durch assoziierte Proteine blockiert sind, welche wie beschrieben bei der Solubilisierung mit Triton X-100 nicht abgelöst werden. Außer dem Peptid 1074 repräsentieren die anderen Antikörper-Peptide C-terminale Bereiche des Proteins, in dem auch die meisten Interaktionspartner bisher identifiziert wurden (vergleiche Abb. 6 B). Selbst wenn keine anderen Proteine an diese Regionen binden, könnte eine Assemblierung der Kanäle zu Homotetrameren [Hoenderop et al., 2003c] diese Bereiche in funktionellen TRPV5 Proteinen in der Plazentamembran für die Antikörper unzugänglich machen. Im N-Terminus liegen mehrere Ankyrin-Elemente, von denen zumindest für das erste eine Beteiligung bei der Assemblierung der Kanaluntereinheiten nachgewiesen ist

[Chang et al., 2004]. Demnach ist auch für den N-terminalen Antikörper eine Blockade des Epitops nach einem ähnlichen Mechanismus denkbar. Ein Phänomen, das bei polyklonalen Kaninchen-Antikörper schon beobachtet wurde, sind univalente Antikörper, bei denen nur eine der beiden Antigenbindedomänen funktionell ist. Wie für diese Antikörper gezeigt wurde, liegt die Ursache dafür in Kohlenhydratresten oder Glykosylierungen der Antikörper in diesem Bereich. Eine sterische Hinderung unterbindet die Präzipitation, allerdings kann durch Deglykosylierung diese Funktion zumindest teilweise wieder hergestellt werden [Labeta et al., 1986]. Eine Deglykosylierung der TRPV5 Antikörper (982/3) führte jedoch nicht zu einer verbesserten Präzipitation (Ergebnisse nicht gezeigt).

Durch eine Kombination von Antikörpern mit verschiedenen Epitopen, die für sich allein genommen TRPV5 nicht immunpräzipitieren können (982/3 7./10./11.Serum + 1052 6.Serum), kann eine Immunpräzipitation trotzdem erfolgreich durchgeführt werden. Am besten geeignet ist die Kombination aus Antikörper 982/3 11.Serum und 1052 6.Serum (Abb. 33). Die größere Anzahl der erkannten Epitope führt dazu, dass mehrere Bereiche des Proteins gleichzeitig erkannt werden und es insgesamt zu einer höher affinen Wechselwirkung kommt. Einen Hinweis darauf, dass mit den Antikörpern tatsächlich TRPV5 präzipitiert wird, gibt die IP aus Maus-Nierengewebe (Abb. 31). Hierbei wird analog zur Plazenta ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa präzipitiert. In dem Blot ist zu sehen, dass bei der Immunpräzipitation nicht immer die glykosylierte und unglykosylierte Form des TRPV5 Proteins zu detektieren sind. Insgesamt ist es sogar häufiger der Fall (58%), dass nur die nicht-modifizierte Form nachgewiesen wird, obwohl die Ergebnisse mit den Mikrosomen und manchen IPs zeigen, dass in der Plazenta beide Proteinformen vorhanden sind. Es könnte allerdings sein, dass der Antikörper eine höhere Affinität für die unglykosylierte Form hat und diese deshalb häufiger präzipitiert wird. Eine sterische Hinderung des großen Glykangerüsts könnte hierfür verantwortlich sein. Wie beschrieben haben Untersuchungen anderer Gruppen bereits gezeigt, dass sowohl TRPV5 als auch TRPV6 Glykosylierungen vom Mannosereichen- und Komplexen-Typ mit mindestens 100 Zuckerresten tragen, die eine molekulare Größenänderung von 10-15 kDa ausmachen [Hoenderop et al., 2003c; Topala et al., 2007].

5.3.3 Affinitätsreinigung von TRPV5 aus der Plazenta und massenspektrometrische Analyse

Zur Untersuchung von putativen Interaktionspartnern soll TRPV5 zusammen mit assoziierten Proteinen aus humanem Gewebe angereichert werden. Da die Kanäle, wie zuvor bei der Validierung der Antikörper bestätigt, in der Plazenta exprimiert sind, werden die Untersuchungen in diesem Gewebe durchgeführt. Mit der Wahl der Anreicherung über Immunpräzipitation bzw. Antikörper-Affinitätschromatographie wurden zwar Methoden ausgewählt, die im Vergleich zu anderen etablierten Methoden zur Identifizierung von Interaktionspartnern aufwendig sind, da unter anderem erst spezifische Antikörper vorhanden sein müssen, dafür spiegeln sie jedoch den *in vivo* Zustand am ehesten wieder. Antikörper zum Nachweis einer Interaktion (z.B. nach Koimmunpräzipitation) gelten zudem noch immer als die sicherste Methode zur Validierung gefundener Interaktionen [Zhou et al., 2007]. Außerdem werden Extrakte aus nativem Gewebe eingesetzt, in dem alle Faktoren (Ionen, Cofaktoren, andere Proteine), die einen Einfluss auf Interaktionen haben können, vorhanden sind. Typische Hochdurchsatz-Screeningmethoden zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wie z.B. das Hefe-2-Hybrid-System oder Interaktionsstudien in heterologen Expressionssystemen stellen eine künstliche Umgebung dar, die oft zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Gerade bei der Hefe-2-Hybrid-Technik [Fields et al., 1989], bei der die Proteine in Hefen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung zusammen gebracht werden, und die Interaktion auf einem Wachstums-Reportersystem beruht werden viele falsch-positive Ergebnisse erzielt [Walhout et al., 2000]. Wie erwähnt gibt es auch Interaktionspartner, die nur in Gegenwart anderer Proteine binden oder die spezielle Cofaktoren benötigen. Gerade bei einem Kalziumkanal wie TRPV5, der selbst durch Kalziumionen reguliert wird (siehe Einleitung), ist es sehr wahrscheinlich, dass manche Proteine nur in Gegenwart von Kalzium binden. So ist für TRPV6 schon die kalziumabhängige Interaktion mit Calmodulin nachgewiesen, die das Inaktivierungsverhalten des Kanals beeinflusst [Hirnet et al., 2003; Niemeyer et al., 2001]. Solche Protein-Protein-Interaktionen können in einem *in vitro* System unter Umständen nicht erfasst werden. Ein weiteres Problem, was gegen den Hefe-2-Hybrid-Assay zur Charakterisierung von Interaktionspartnern spricht, ist die Untersuchung von Membranproteinen. Auch wenn es mittlerweile Weiterentwicklungen des 2-Hybridsystems, wie das SOS-Recruitment-System [Aronheim et al., 1997] oder das Split-Ubiquitin System [Johnsson et al., 1994] gibt, die sich für Membranproteine eignen. Die rekombinante Expression von solchen Proteinen mit ihren hydrophoben Transmembrandomänen ist nicht ganz unproblematisch, so dass eine Solubilisierung aus nativem Gewebe oft einfacher zu handhaben ist. Ein weiteres Problem, speziell für TRPV5 besteht darin, dass die komplette

cDNA des Proteins vorhanden sein muss. Dies war zumindest für das humane TRPV5 Protein nicht der Fall und es hätte zunächst selbst aus einer cDNA Bibliothek kloniert werden müssen. Andere typische Methoden, wie die Liganden-Affinitätschromatographie sind für TRPV5 nicht anwendbar, weil bisher keine hochaffinen Liganden des Proteins bekannt sind.

Für die IP ist in Abschnitt 5.3.2 beschrieben, dass TRPV5 eindeutig aus der Plazenta isoliert werden kann. Zur IP mit anschließender massenspektrometrischer Analyse wurde die dreifache Menge an Gesamtprotein eingesetzt wie für eine Standard-IP mit anschließendem Western Blot, da zur Identifizierung von Interaktionspartnern in der Massenspektrometrie deutlich mehr Protein notwendig ist, als für eine Western Blot Analyse [Zhou et al., 2007]. Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse konnte allerdings trotz der Verwendung des milden Detergenz Triton X-100 weder das TRPV5 Protein selbst noch damit assoziierte Proteine eindeutig identifiziert werden. Es wurden nur drei Proteine identifiziert, allerdings mit niedrigen Scorewerten, die für weitere Untersuchungen einer tatsächlichen Interaktion mit TRPV5 in Frage kommen: die Annexine A1 und A2 sowie Cyclophilin B (Tabelle 19). Annexin A2 wurde bereits in *in vitro* Bindungsstudien als Interaktionspartner von TRPV5 beschrieben, allerdings nur indirekt über die Bildung eines heterotetrameren Komplexes mit S100A10, über welches die Interaktion stattfindet [van de Graaf et al., 2003]. S100A10 konnte jedoch in meiner Arbeit nicht identifiziert werden. Geht man davon aus, dass die Komplexe durch das SDS im Probenpuffer und dem Gel getrennt werden, befindet sich das nur 11 kDa große Protein im Gel nicht in einem Bereich der massenspektrometrisch analysiert wurde (Abb. 34). Annexine zählen zu den stark exprimierten Proteinen [Kaczan-Bourgeois et al., 1996], auch in der Plazenta, so dass möglicherweise eine unspezifische Interaktion der Proteine untereinander oder mit dem Chromatographie-Säulenmaterial detektiert wurde. Cyclophilin B (CypB) wurde in der gleichen Bande wie die Annexine identifiziert, also bei etwa 80 kDa, obwohl das Protein ein theoretisches Molekulargewicht von 24 kDa besitzt. Eine direkte Interaktion zwischen TRP-Kanälen und CypB ist bisher nur für TRPV6 nachgewiesen und charakterisiert. CypB, eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase, aktiviert die TRPV6 induzierte Ca^{2+} -Aufnahme in Oocyten nach heterologer Koexpression. Interessanterweise zeigt CypB den genau gegenteiligen Effekt bei Koexpression mit TRPV5 in *X. laevis* Oocyten, nämlich einen Rückgang des Kalziumeinstroms [Stumpf et al., 2008]. In den Ansätzen, die zur Identifizierung der Interaktion von CypB mit TRPV6 führten, konnte TRPV5 nicht identifiziert werden. Möglicherweise war die Menge des isolierten TRPV5 Proteins zu gering. Andere Ursachen könnten in der massenspektrometrischen Analyse

begründet sein: nach der Affinitätsreinigung wurden die Proteine tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Hier werden aber nur Peptide identifiziert, die als Modifizierungen Carbamidomethylierungen und Methylgruppen enthalten. Die Proteine enthalten bereits aus der Zelle posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, wodurch diese Peptide nicht erfasst werden und so die Anzahl der gefunden Peptide reduziert wird. Zu erwähnen bleibt noch, dass zur Solubilisierung von TRPV6 in dieser Studie [Stumpf et al., 2008] das Detergenz Natriumdeoxycholat verwendet wurde, was für TRPV5 nicht geeignet ist (Abschnitt 5.3.1). Insgesamt sollten diese nach der Immunpräzipitation in dieser Arbeit gewonnenen Massenspektrometrie-Daten kritisch betrachtet werden, da sie nur auf der Auswertung eines Versuchs beruhen und bei Analyse eines weiteren Versuchs nicht gefunden wurden.

Eine IP in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse ist prinzipiell möglich, allerdings werden durch die Elution auch die Antikörper, die nicht-kovalent gebunden ist, von dem Agarosematerial abgelöst und sind im Eluat vorhanden. Die hohe Konzentration an IgGs kann bei der massenspektrometrischen Analyse dazu führen, dass die Signale wenig abundanter Proteine überlagert werden. Weiterhin bedingt die Methode einen hohen Verbrauch an Antikörpern. Eine Technik, die all diese Nachteile nicht hat, ist die Antikörper-Affinitätschromatographie, bei der die Antikörper kovalent mit dem Säulenmaterial verbunden sind und die Säule dadurch mehrmals verwendet werden kann. Zur kovalenten Kopplung gibt es mehrere Methoden, von denen in dieser Arbeit zwei ausgetestet wurden. Sowohl die Kopplung an Protein A-Agarose mittels eines Quervernetzers als auch an AminoLink-Agarose verlief erfolgreich und die Antikörper lassen sich in Gegenwart von Glycin (pH 2,2) nicht von der Säule ablösen. Ein Austesten und weitere detailliertere Untersuchungen im Rahmen der Diplomarbeit von Pascal Schalkowsky [2009] ergaben, dass eine Affinitätsreinigung bei Kopplung der Antikörper an Protein A-Agarose effektiver ist, so dass diese Methode zur Kopplung im präparativen Maßstab gewählt wurde. Das Prinzip der Bindung der Antikörper über ihren F_c -Teil an Agarosematerial für eine klassische Immunpräzipitation und zur kovalenten Kopplung an Protein A ist gleich (Abb. 42 A und B). In beiden Fällen werden die Antikörper gerichtet an das Agarosematerial gekoppelt und die Antigenbindedomäne (F_{ab}) des Antikörpers bleibt auch nach dem Quervernetzen frei zugänglich (Abb. 42 B), was ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist. Im Gegensatz dazu erfolgt die AminoLink-Kopplung (Abb. 42 C) über primäre Amine zwischen Antikörper und Agarosematerial, wobei Amine auch in der F_{ab} -Region des Antikörpers vorhanden sind und somit die Ausrichtung der gekoppelten Antikörper am Agarosematerial zufällig ist. Die

Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit der hergestellten Antikörper-Affinitätssäule erzielt werden konnten, entsprechen nicht den Erwartungen, da zusätzlich in der Negativkontrolle (Präimmunsäule) schwache Signale im gleichen Größenbereich wie in der eigentlichen Probe detektiert wurden (Abb. 34). Zudem konnte keine distinkte Bande für TRPV5 nachgewiesen werden sondern nur ein Schmier, der darauf hindeutet, dass die Proteine nicht vollständig gelelektrophoretisch getrennt wurden. Entweder war die Menge an aufgetragenem Protein im Gel zu hoch, oder die Denaturierung nicht ausreichend. Denkbar wäre auch, dass die Affinitätsreinigung von TRPV5 deshalb nicht funktioniert hat, weil durch Zugabe des Quervernetzers (DSS) zur kovalenten Kopplung die F_{ab} -Regionen der Antikörper vernetzt wurden und so TRPV5 nicht mehr binden konnten [Kaboord et al., 2008]. Entweder müsste dann eine andere Kopplungsmöglichkeit ausprobiert werden, oder zur Reduzierung der unerwünschten Quervernetzung in den Antigenbindedomänen die Menge an DSS in kleinen Schritten reduziert werden um ein optimales Verhältnis zwischen Quervernetzung und Erhalt der F_{ab} -Region zu finden [Kaboord et al., 2008].

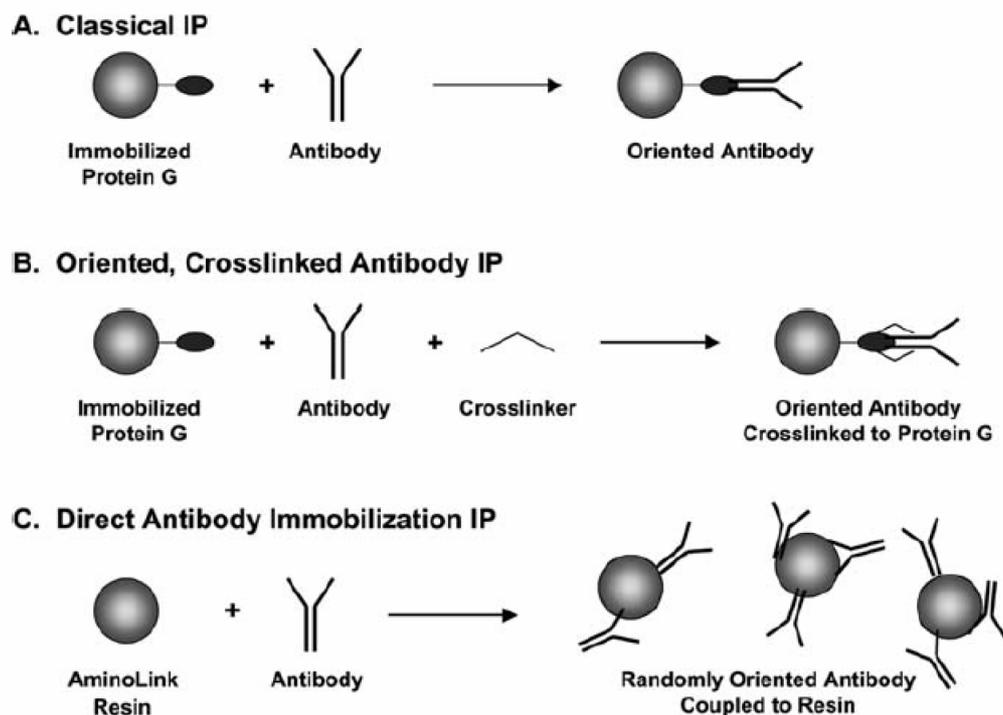


Abb. 42: Varianten zur Kopplung eines Antikörper an Säulenmaterial.

(A) Bei einer klassischen IP werden die Antikörper über ihren F_c -Teil an dem Säulenmaterial immobilisiert und das Material ohne weitere Behandlung für die Präzipitation eingesetzt. (B) Zur kovalenten Kopplung der Antikörper durch Quervernetzen (crosslinken) wird der Antikörper wie in (A) gerichtet gebunden und anschließend über einen homobifunktionalen Quervernetzer wie z.B. DSS mit dem Säulenmaterial verbunden. (C) Beim Koppeln mit aktiviertem Säulenmaterial, wie bei der AminoLink Kopplung, werden die Antikörper ungerichtet über primäre Aminogruppen, die auch in der F_{ab} -Region vorhanden sind, mit dem Säulenmaterial verknüpft. [Kaboord et al., 2008]

5.3.4 Pulldown-Assays zur massenspektrometrischen und Western Blot Analyse

Pulldown-Assays wurden durchgeführt, um neue TRPV5 Interaktionspartner speziell in humanem Plazentagewebe zu identifizieren. Die Kenntnis von assoziierten Proteinen ist sehr wichtig bei der Aufklärung von physiologischen und regulatorischen Prozessen, in die ein Protein eingebunden ist – wie im Falle von TRPV5 z.B. der Kalziumhomöostase. Proteine üben ihre Funktion nicht als einzelnes aus, sondern funktionieren meist nur in großen Komplexen aus verschiedenen Biomolekülen. In diesen können neben Proteinen auch DNA, RNA oder kleine (an-)organische Moleküle anwesend sein, die ein Regulationsnetzwerk bilden [Zhou et al., 2007]. Für TRPV5 sind schon einige Interaktionspartner identifiziert worden, die in der Einleitung beschrieben sind und zeigen, dass das Protein auf verschiedenen Ebenen kontrolliert wird. Die Aktivität des Kanals steht z. B. stark unter extrazellulärer Kontrolle (Überblick in [de Groot et al., 2008; Schoeber et al., 2007; van de Graaf et al., 2006b]). Da die Identifizierung von TRPV5-Interaktionspartnern mit der Antikörper-Affinitätschromatographie nicht möglich war, wurden parallel mit den GST-TRPV5-Fusionsproteinen des kompletten N- und C-Terminus (N7 bzw. C4) Pulldown-Experimente mit humanem Plazentagewebe durchgeführt. Eine massenspektrometrische Analyse der in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine führte insgesamt zur Identifizierung 38 verschiedener putativer Interaktionspartner, die in Tabelle 20-Tabelle 23 aufgelistet sind. Auch wenn alle Proteine in der Tabelle einen signifikanten Score haben, und in mehr als einem Versuch gefunden wurden, kommt ein Teil der Proteine aus verschiedenen Kriterien als Interaktionspartner nicht in Betracht. Ein Teil der Proteine, die aufgeführt sind wurden zwar nicht in GST-Proben (Negativkontrolle) vom Plazentahomogenat gefunden aber in GST-Proben der Mikrosomen und umgekehrt. Die gefundene Bindung ist demnach eher unspezifisch. Hierbei handelt es sich um Proteine wie z.B. die Alkalische Phosphatase, das 29 kDa Protein, die Aminoxidase, einen Glucosetransporter (SLC2A1) und vereinzelte ribosomale Proteine. Da die Versuche mit beiden Ausgangsmaterialien aber getrennt betrachtet wurden, sind diese in den Tabellen nicht entfernt worden. Da nur eine kleine Anzahl an Gelen untersucht wurde ($n=7$) und auf jedem Gel nur einmal GST als Negativkontrolle war (Verhältnis Banden GST : GST-TRPV5-Fusionsprotein entspricht 1 : 2,57), ist es gut möglich, dass durch die Negativkontrolle nicht alle unspezifisch bindenden Proteine identifiziert wurden. Eine weitere Proteinfamilie, die vermutlich nicht als Bindungspartner in Betracht kommt, sind Ribosomen-assoziierte Proteine. Diese Gruppe von Proteinen (RPL und RPS) der großen (L) und kleinen Untereinheit (S) repräsentiert immerhin 42% aller gefundenen Proteine. Da das eukaryotische 80S Ribosom einer der größten

makromolekularen Komplexe in der Zelle ist [Link et al., 1999], ist die Anzahl ribosomaler Proteine in der Zelle allerdings sehr hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese bei den vorhandenen GST-Proben gar nicht alle zu finden und so eliminiert werden konnten, ist dementsprechend groß. Eine Interaktion mit funktionellen TRPV5 Kanälen ist sehr unwahrscheinlich, da sie für die Translation der Proteine verantwortlich sind und selten sonstige regulatorische Funktionen haben. Ein erhöhter Anteil dieser Proteine ist auch in den Mikrosomen-Ansätzen identifiziert worden, wahrscheinlich dadurch bedingt, dass bei der Anreicherung der Membranen vor allem das endoplasmatische Retikulum (ER) (je nach Gewebe bis zu 80% der Mikrosomen-Proteine [Beaufay et al., 1974]) angereichert wird, auch das raue ER an das viele Ribosomen gebunden sind. Gerade bei hoch-abundanten Proteinen besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass sie als Kontaminationen mit isoliert werden und sie keine echten Bindungspartner des Fusionsproteins sind [Graumann et al., 2004]. Eine Meta-Analyse der am häufigsten in der Massenspektrometrie gefundenen differentiell exprimierten Proteine, unabhängig von Spezies und Gewebe, wurde 2008 veröffentlicht [Petрак et al., 2008]. Zu den am häufigsten gefundenen Proteinfamilien zählen die Keratine, Annexine, Peroxiredoxine, Aktine und HSP27. Von diesen Top 5 Familien wurde auch bei der vorliegenden massenspektrometrischen Analyse aus jeder Gruppe mindestens ein Protein gefunden. In der weiteren Betrachtung von putativen Interaktionspartnern von TRPV5 wurden auch die meisten Proteine, die zu diesen Familien gehören nicht weiter untersucht. Keratine werden häufig durch die Probenvorbereitung nachträglich durch Haar- und Hautschuppen eingebracht. Die Gegenwart von Hitzeschock- und anderen Stressproteinen ist auch nicht verwunderlich, da sie immer gebildet werden, wenn das Gewebe nicht im physiologischen Umfeld ist. Peroxiredoxine (gefunden Peroxiredoxin-5) sind thiol-spezifische Proteine, die antioxidant wirken, indem sie Peroxide (z.B. Wasserstoffperoxid) in der Zelle reduzieren [Hofmann et al., 2002; Wood et al., 2003]. Sie machen 0,1–0,8% aller löslichen Proteine in Säuger-Zellen aus [Chae et al., 1999]. Zudem ist bekannt, dass Glutathion-S-Transferasen (GST) Peroxiredoxine regenerieren können, so dass es gut möglich ist, dass die Interaktion über den GST-Anteil des TRPV5-Fusionsproteins stattgefunden hat [Manevich et al., 2004] und nicht über TRPV5. Eine Gruppe von Proteinen, die auch zu den hoch-abundanten und häufig gefundenen Proteinen zählt, sind die Annexine. Sie sind Bestandteil des Zytoskeletts und eine indirekte Interaktion von TRPV5 mit Annexin A2 über S100A10 ist wie bereits erwähnt schon nachgewiesen worden [van de Graaf et al., 2003]. Diese Interaktion konnte in meiner Arbeit nicht bestätigt werden, sondern Annexin A2 wurde häufig in Ansätzen mit dem GST-Protein, also in der Negativkontrolle, identifiziert. In der publizierten Studie wurde die

Interaktion zwischen TRPV5 und Annexin A2 mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Technik gefunden. Zusätzlich wurde diese Interaktion in Pulldown-Assays mit C-terminalen GST-TRPV5 Fusionsproteinen bestätigt, bei denen die Fusionsproteine mit Oozytenlysaten inkubiert wurden, die zuvor mit S100A10/Annexin2 cRNA injiziert wurden. Im Western Blot ist gezeigt, dass S100A10 nicht an GST bindet, aber sowohl an TRPV5 und TRPV6-Fusionsproteine. Annexin A2 bildet einen heterotetrameren Komplex mit S100A10 aus je 2 Homodimeren [Rety et al., 1999; Zokas et al., 1987] und gehört zu den Ca^{2+} und Phospholipid bindenden Proteinen [Gerke et al., 2002]. Allerdings bei Verwendung von Lysaten aus Zellen, die TRPV5 und S100A10/Annexin koexprimieren war eine Koimmunpräzipitation in dieser Studie nicht möglich. Eine Interaktion der drei Proteine ist prinzipiell denkbar, da sie alle sowohl in der Apikalmembran in den entsprechenden Tubuli der Niere (DCT2) und vermehrt in der Apikalmembran des STB der Plazenta exprimiert werden [Kaczan-Bourgois et al., 1996]. Gleichzeitig konnte in der Plazenta gezeigt werden, dass die Menge an Annexin A2 und S100A10 mit dem Verlauf der Schwangerschaft progressiv ansteigt, und sie eventuell eine Rolle im Differenzierungsprozess der Plazenta spielen. Für andere Gewebe ist gezeigt, dass eine Zunahme der beiden Proteine im Zusammenhang mit Zelldifferenzierungsprozessen steht [Braslau et al., 1984; Harder et al., 1993]. Die tetramere Form von S100A10 und Annexin A2 ist markant in sekretorischen und polarisierten Zellen, wie dem STB [Zokas et al., 1987], wo eine Assoziation mit dem submembranären Zytoskelett der Mikrovilli vorliegt [Edwards et al., 1987; Webb et al., 1987]. Ein Annexin, das in dieser Arbeit identifiziert wurde ist Annexin A6. In der Plazenta ist es sowohl in Zytotrophoblasten, im STB, dem fötalen Endothelium und Choriontrophoblasten während der Schwangerschaft exprimiert [Rambotti et al., 1993]. Während der Schwangerschaft bleibt die Expressionsrate in der Apikalmembran, im Gegensatz zu Annexin A2, unverändert [Kaczan-Bourgois et al., 1996]. Da Annexine ähnlich aufgebaut sind, ist eine Interaktion von TRPV5 mit anderen Annexinen als Annexin A2 gut möglich. Ein Einfluss von Annexin A6 auf Kalziumkanäle konnte bisher in sensorischen Neuronen gezeigt werden, wo es einen negativen regulatorischen Effekt auf die Kalzium-Leitfähigkeit hat [Naciff et al., 1996]. Demnach wäre ein Einfluss auf andere Kalziumkanäle in anderen Geweben auch denkbar. Eine tatsächliche Interaktion mit TRPV5 müsste aber erst noch mit anderen Methoden bestätigt werden.

Ein Protein, das in Pulldown-Versuchen mit Plazentasmikrosomen (zusammen mit N7 und C4) gefunden wurde, ist das Transmembranprotein TM7SF3, welches sieben putative Transmembran-Regionen besitzt. Diese Tatsache erklärt, warum es gerade aus Mikrosomen gebunden wurde, bei denen speziell die Membranen angereichert sind. Seine Expression

wurde in vielen humanen Geweben identifiziert, mit der höchsten Rate in der Niere, aber auch schwach in der Plazenta [Akashi et al., 2000]. Weitere Informationen sind über dieses Protein bisher nicht bekannt und der Score mit der das Protein identifiziert wurde (beide 46) ist recht niedrig.

POTE E wurde auch in zwei unabhängigen Versuchen, gebunden an N7 aus Plazentahomogenat, gefunden. Das Gen wurde ursprünglich bei der Suche nach Genen identifiziert, die zur Therapie oder Diagnose von Prostatakarzinomen eingesetzt werden können. Auf RNA-Ebene wurde es in der Prostata (**p**rostate), der Plazenta (**p**lacenta), dem Ovar (**o**var) und Hoden (**t**estis) gefunden, aus deren Anfangsbuchstaben sich der Name des Proteins zusammensetzt [Bera et al., 2002]. Das Gen kodiert für ein Protein von 66 kDa und besitzt sieben Ankyrin-Elemente. Da TRPV5 auch mehrere dieser Elemente besitzt [Chang et al., 2004; Eler et al., 2004] und diese zur Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen bekannt sind, wäre eine Interaktion der beiden Proteine über diese Bereiche möglich. Passend zu dieser Theorie wurde das Protein auch nur in Proben mit dem N-terminalen TRPV5-Fusionsprotein identifiziert, in denen die Ankyrin-Elemente von TRPV5 lokalisiert sind. In TRPV5 sind Ankyrin-Repeats für die Kanalassemblierung und Funktionalität von Bedeutung. Auch andere TRP-Proteine der TRPV, TRPC, TRPN und natürlich TRPA (A steht für Ankyrin)-Familie [Lepage et al., 2007; Schindl et al., 2007] enthalten mehrere Ankyrindomänen, so dass man vermutet, dass diese Bereiche allgemein zur Tetramerisierung und somit Ausbildung funktioneller TRP-Kanäle wichtig ist. Denkbar wäre, dass POTE E durch Bindung an die Ankyrinelemente von TRPV5 eventuell die Kanalassemblierung verhindert, oder umgekehrt, die Assemblierung als Adaptermolekül unterstützt.

Unter den identifizierten Proteinen sind nur zwei, die vorher schon im Zusammenhang mit TRPV5 beschrieben wurden, Galectin-1 und der Regulationsfaktor NHE-RF2. Die Funktion von Galectin-1 wurde bereits ausführlich beschreiben (Abschnitt 5.2.2, Abb. 40). Dass dieses Lektin in diesem Zusammenhang mit den zytosolischen Bereichen von TRPV5 (N+C-Terminus) interagiert ist eher unwahrscheinlich, da es an der Verankerung der TRPV5 Kanäle in der Membran durch die Interaktion mit den Zuckerresten beteiligt ist [Cha et al., 2008]. Möglicherweise hat an eines der TRPV5-Fusionsproteine ein endogenes TRPV5-Protein, das noch mit Galectin-1 assoziiert war, gebunden und wurde so identifiziert.

Für das zweite Protein, das bereits als Interaktionspartner von TRPV5 bekannt ist, den Na^+/H^+ -Austauscher Regulationsfaktor 2 (NEH-RF2), ist in der Literatur beschrieben, dass er an den absoluten C-Terminus bindet (Aminosäuren 727-729) und die Anzahl von TRPV5-

Kanälen in der Plasmamembran kalziumabhängig erhöht [Embark et al., 2004]. Dazu wurde gezeigt, dass die erste PDZ-Domäne in NHERF2 für die vermehrte Expression in der Membran wichtig ist und die zweite PDZ-Domäne für die Stabilität von TRPV5 in oder den Transport zu der Plasmamembran von Bedeutung ist [Palmada et al., 2005]. Die beschriebene Interaktion ist allerdings nur *in vitro* in injizierten Oocyten untersucht worden und bedarf noch einer Bestätigung im nativen Gewebe.

Für drei der am häufigsten identifizierten Proteine, wurden zusätzliche Pulldown-Versuche durchgeführt und im Western Blot deren Bindung an TRPV5 bestätigt. Sowohl für 11 β -HSD2 als auch für Ku70 und Calpain-6 wurde im Western Blot eine spezifische Interaktion mit dem N- und C-Terminus nachgewiesen und keine mit dem GST-Protein (Negativkontrolle). Eine Interaktion ist somit sehr wahrscheinlich, müsste allerdings noch durch weitere Methoden, wie z.B. Koimmunpräzipitationen, bestätigt werden. 11 β -HSD2 wurde nur in zwei Gelen zusammen mit N7 identifiziert, und auch im Western Blot ist das Signal beim Pulldown mit C4 sehr schwach. Dies deutet darauf hin, dass eine Interaktion tatsächlich nur mit dem N-Terminus stattfindet. Die beiden anderen Proteine wurden in Proben mit N7 und C4 in der kombinierten Suche mit den kompletten Spuren gleichermaßen gefunden. Alle aus den SDS-Gelen ausgeschnittenen Banden wurden anschließend noch einzeln auf das Vorhandensein eines dieser drei Proteine untersucht (Tabelle 24). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Proteine zumeist in Proteinbanden mit ihrem korrelierenden Molekulargewicht identifiziert wurden. In mehreren Banden wurde zusätzlich das TRPV5-Fusionsprotein gefunden. Bei dem N-terminalen Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa kann man erwarten, dass es auf etwa der gleichen Höhe wie Ku70 (70 kDa) und Calpain-6 (74 kDa) im SDS-Gel läuft, da diese beide ein ähnliches Molekulargewicht haben. Ebenso hat das C-terminale Fusionsprotein mit ca. 44 kDa das gleiche Molekulargewicht wie 11 β -HSD2. Aber auch das C-terminale Protein wurde in Gelbanden bei einem Molekulargewicht von mehr als 70 kDa zusammen mit Ku70 und Calpain gefunden (Bande Nummer 4, 12 und 23 in Abb. 37 + Abb. 38) gefunden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Proteine mit hoher Affinität wechselwirken und die entstandenen Proteinkomplexe durch β -Mercaptoethanol und SDS nicht vollständig dissoziiert werden. In Bande 23 (C4-Fusionsprotein / Plazentamikrosomen) wurde Ku70 sogar zusammen mit TRPV5 identifiziert, bei dem ein gefundenes TRPV5-Peptid dem N-Terminus des Proteins zugeordnet werden kann und die Sequenz dieses Peptids spezifisch für das TRPV5 Protein ist, was als starker Hinweis für eine tatsächliche Interaktion der beiden Proteine gewertet werden kann. Sehr oft werden Calpain-6

und Ku70 zusammen in einer Bande detektiert, was zum einen dadurch begründet sein könnte, dass sie ein ähnliches Molekulargewicht haben, aber zum anderen könnten sie auch gleichzeitig eine Interaktion mit TRPV5 eingehen, oder selbst miteinander interagieren.

5.3.5 11 β -HSD2

11 β -HSD2 (11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2) ist in der Plazenta, als Gewebe mit der stärksten Expression [Shams et al., 1998], ebenso wie TRPV5 im Synzytiotrophoblasten lokalisiert [Brown et al., 1993; Brown et al., 1996; Krozowski et al., 1995; Lakshmi et al., 1993]. Im Vergleich zu Isoform 1 scheint die in dieser Arbeit gefundene Isoform 2 in der Plazenta die vorherrschende Form zu sein [Brown et al., 1993]. Unter physiologischen Bedingungen in der Plazenta besitzt das Enzym eine Oxidase-Aktivität, die zur Umwandlung von Cortisol in Cortison (beides Glucocorticoide) führt [Sun et al., 1999]. Nach übereinstimmender Meinung besteht die Funktion von 11 β -HSD2 in der Plazenta darin, den Fötus vor einer zu hohen maternalen Cortisol-Konzentrationen zu schützen, in dem es in die inaktive Form Cortison umgewandelt wird. Damit bildet 11 β -HSD2 die so genannte Plazenta-Schranke für Glucocorticoide [Yang, 1997]. Glucocorticoide (GC) spielen eine wichtige Rolle bei der Geburt, aber auch für das fötale Wachstum und die Reifung [Liggins, 1994]. Werden zu viele GCs von der Mutter zum Kind transportiert ist ein vermindertes fötales Wachstum zu beobachten und es kommt nach der Geburt beim Kind zu schweren Störungen, gekennzeichnet durch Bluthochdruck, Insulinresistenz und Verhaltensstörungen [Benediktsson et al., 1993; Holmes et al., 2006; Stewart et al., 1995]. Von Ulick wurde erstmals 1979 der Phänotyp dieses heute genannten AME-Syndroms (**a**pparent **m**ineralglucocorticoid **e**xcess) beschrieben [Ulick et al., 1979; Ulick et al., 1989], welches ausschließlich auf einem Defekt im Gen von 11 β -HSD2 beruht. Die typischen Symptome des AME-Syndroms sind auch bei 11 β -HSD2-Knockout Mäusen beobachtet worden, die ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen und nach der Geburt an Bluthochdruck leiden [Holmes et al., 2006]. Zusätzlich weisen sie im letzten Drittel der Entwicklung eine verminderte Fähigkeit auf, das fötale Gefäßnetzwerk auszubauen und zeigen einen erhöhten Aminosäure- aber vermindertem Glucosetransport im STB [Hewitt et al., 2006a; Hewitt et al., 2006b; Wyrwoll et al., 2009]. Entsprechend diesem Einfluss von 11 β -HSD2 auf den Nährstofftransport in der Plazenta ist auch ein Einfluss auf TRPV5 als Kalziumkanal denkbar. Zumal 11 β -HSD2 im gleichen subzellulären Bereich der Plazenta (im STB) exprimiert und, ähnlich wie TRPV5, vorwiegend in der villösen Apikalmembran lokalisiert ist. Betrachtet man sich die bisher bekannten Regulationsmechanismen, so fällt auf, dass das Enzym stark

durch Steroide (GCs, Progesteron) und Produkten des Lipoxygenase (LOX)- bzw. Cyclooxygenase-Metabolismus des Arachidonsäure (Prostaglandine) reguliert ist. Progesteron, ein Steroid, das zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft notwendig ist [Pepe et al., 1995; Sun et al., 1998] und LOX-Produkte, die unter anderem bei intrauterinen Infektionen entstehen, haben in der Plazenta einen negativen Effekt auf das Protein [Hardy et al., 1999; Schafer et al., 1996]. LOX Produkte sind auch in die Progesteron-Bildung im Ovar involviert [Taniguchi et al., 2002; Wang et al., 1989] und könnten somit in der Plazenta ähnliche Effekte haben wo sie gemeinsam die Aktivität von 11 β -HSD2 hemmen, zumal Cortisol die Prostaglandin-Produktion (LOX-Produkte) erhöhen kann [Sato et al., 2008]. Passend dazu ist der TRPV5-Kanal ebenfalls durch verschiedene Hormone (z.B. Parathormon, Östrogene, Klotho, siehe Einleitung) reguliert. Eine erhöhte Expression von Glucocorticoiden (durch verminderte Aktivität von 11 β -HSD2) resultiert zudem in Mäusen in einer verminderten Knochendichte [Jia et al., 2006], ein Phänomen, was auch bei TRPV5 Knockout-Mäusen beobachtet wurde [Hoenderop et al., 2003b]. Interessanterweise inhibiert gerade Kalzium in der Plazenta die Aktivität von 11 β -HSD2 [Hardy et al., 2001]. Die Aktivität des Enzyms zur Umwandlung von aktivem Cortisol in inaktives Cortison, ist bei Erhöhung des freien intrazellulären Kalziums um bis zu 50% reduziert, was sowohl in im zellfreien (Plazentamikrosomen) und im Zellkultursystem (JEG-3-Zellen) gezeigt wurde. Die Bindung von freiem Kalzium durch EGTA, kehrt die Inhibierung um und erhöht die Aktivität auf 200%, wobei die Fähigkeit zur Substratbindung (Cortisol) bei der Kalzium-vermittelten Inhibierung nicht beeinträchtigt wird, weshalb das Kalzium anscheinend die katalytische Aktivität moduliert. Im intakten Zellsystem kann die Inhibierung von 11 β -HSD2 durch eine Prostaglandin F-vermittelte Erhöhung des intrazellulären Kalziums ausgelöst werden. Ein Kalziueinstrom durch TRPV5 könnte also auch einen inhibierenden Effekt auf 11 β -HSD2 haben und zur posttranskriptionellen Regulation von 11 β -HSD2 beitragen. Die Regulation von 11 β -HSD2 scheint insgesamt ziemlich stark von Kalzium beeinflusst zu sein, da auch proinflammatorische Zytokine in der Plazenta einen inhibierenden Effekt über Ca²⁺ und cAMP-Signalwege zeigen [Kossintseva et al., 2006]. Wie TRPV5 sind 11 β -HSD2 Enzyme auch in der Niere exprimiert, wo sie für die Inaktivierung von aktiven GCs verantwortlich sind, bevor diese an den Mineralglucocorticoid-Rezeptor binden und ihn inaktivieren können [Hirasawa et al., 1997]. Eine Interaktion von 11 β -HSD2 und TRPV5 zur Regulation des Nährstofftransports in der Plazenta, oder auch bei Differenzierungsprozessen, die durch Hormone reguliert werden, ist also durchaus denkbar.

5.3.6 Ku70

Ku70 ist das Produkt des Gens XRCC6 und hat neben dem hier verwendeten Namen noch zahlreiche weitere Synonyme wie Nuclear factor IV, Transferrinrezeptor-Promotorelement-Bindfaktor, Proximales Sequenzelement 1, Ende-bindendes Protein und ATP-abhängige DNA-Helikase 2 Untereinheit 1 [Tuteja et al., 2000]. Die Namen deuten schon auf die zahlreichen Funktionen des Proteins hin, weshalb es in der Literatur auch als "Moonlighting"-Protein bezeichnet wird, also ein Protein, das mehrere Funktionen gleichzeitig ausübt [Jeffery, 1999; Paupert et al., 2007]. Ein Teil der Aufgaben bestehen im Zellkern, wo das Protein im Komplex mit Ku80 (auch Ku86 Ku p80) vorliegt und das Ku-Protein bildet, das erstmals als Autoantigen in Seren von Patienten mit Polymyositis-Syndrom entdeckt wurde [Mimori et al., 1981]. Zu den Aufgaben im Zellkern zählen vor allem die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Säugerzellen, aber auch ein Funktion bei der V(D)J-Rekombination und in der Telomer-Regeneration ist bekannt (zusammengefasst in [Hefferin et al., 2005]). Zusätzlich zu den Aufgaben im Zellkern, ist Ku70 auch an der Oberfläche zahlreicher Zellen (Makrophagen, Endothelzellen, Erythrozyten-Vorläuferzellen) und Tumorzellen als membran-assoziiertes Protein exprimiert [Koike, 2002; Muller et al., 2005; Prabhakar et al., 1990]. Erstmals wurde es 1989 von Chan und Mitarbeitern als Membran-durchspannendes Protein beschrieben [Chan et al., 1989]. Eine Funktion bei der Zelladhäsion [Lynch et al., 2001; Teoh et al., 1998], bei Zell-Matrix-Verbindungen [Monferran et al., 2004a] und proteolytischen Prozessen durch Matrix-Metalloproteinase 9-Interaktion [Monferran et al., 2004b] ist auch beschrieben. Aufgrund dieser Funktionen wird eine Involvierung des Ku-Proteins in Invasionsprozesse, nicht nur von Krebszellen, vorgeschlagen und auch eine Rolle bei der zellulären Differenzierung angenommen [Paupert et al., 2007]. Die Ku70-Untereinheit, als monomere Form vorliegend, wurde in fast allen bisher untersuchten Geweben gefunden, so auch in der Plazenta [Choi et al., 2002]. Auch wenn Ku70 in dieser Arbeit in Homogenat- und Mikrosomen-Proben gefunden wurde, ist über Immunhistochemie und in Western Blots gezeigt, dass es im STB im Vergleich zu Stroma und Cytotrophoblasten-Zellen weniger stark exprimiert ist [Choi et al., 2002]. Es war aber das Protein, was in den kombinierten Suchen mit den kompletten Spuren und bei der Auswertung der einzelnen Banden in dieser Arbeit am häufigsten gefunden wurde. In Ku70- Knockout-Mäusen ist nicht nur die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur gestört, sondern es kommt auch zu Wachstumsstörungen [Gu et al., 1997], ein weiterer Hinweis darauf, dass das Protein in Wachstumsprozesse involviert ist. Eine Interaktion von Ku70 mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor konnte unter bestimmten Bedingungen auch gezeigt werden, so

dass man spekulieren kann, dass bei einer Interaktion von TRPV5 mit Ku70 in der Plazenta das invasive Wachstum reguliert wird. Da zudem eine Rolle von Ku70 bei der Zelladhäsion beobachtet wurde, könnte auch die Verankerung der Plazenta in der maternalen Dezidua das Ziel sein. In beiden erwähnten Prozessen (Plazentainvasion und –Adhäsion) sind extravillöse Trophoblasten (EVTs) der Plazenta beteiligt [Kemp et al., 2002], die zusätzlich noch an der plazentaren Freisetzung von Hormonen und Wachstumsfaktoren mitwirken [Handschuh et al., 2007]. Bisher ist eine Lokalisation von TRPV5 in EVTs in der Literatur nicht beschrieben. Wir konnten aber im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Nina Himmerkus (Universität Kiel, AG Bleich) unter Verwendung der in dieser Arbeit validierten TRPV5-Antikörper zeigen, dass TRPV5 in der Plazenta neben dem STB auch sehr stark in den extravillösen Trophoblasten exprimiert wird. Dies würde die oben aufgezeigte Theorie unterstützen und möglicherweise alternative Funktionen zum Kalziumtransport von TRPV5 von der Mutter zum Fötus in der Plazenta erklären. Denkbar ist, dass TRPV5 in den extravillösen Trophoblasten der Plazenta in Differenzierungsprozesse (invasiven Wachstums) involviert ist, möglicherweise unter Beteiligung von Ku70.

5.3.7 Calpain-6

Calpaine sind eine Gruppe intrazellulärer nicht lysosomaler, hoch Kalzium-abhängiger Cystein-Proteasen, die eine große Anzahl an Substraten aus verschiedensten zellulären Prozessen haben [Demarchi et al., 2007]. In Säugetieren wurden bislang 14 Mitglieder entdeckt, wobei Calpain 1 und 2 am besten untersucht sind [Goll et al., 2003]. Calpain-6 nimmt innerhalb dieser Gruppe eine Sonderstellung ein, da es die Calmodulin-ähnliche Domäne nicht mehr besitzt, die bei den anderen Calpainen für die proteolytische Aktivität verantwortlich ist [Berti et al., 1995; Dear et al., 1997]. Auch das Expressionsmuster ist stark eingeschränkt. Wird das Protein während der Embryogenese noch in vielen fötalen Geweben wie Skelettmuskeln, Herz, Lunge und Niere hoch exprimiert, so ist es nach der Geburt von 50 untersuchten Geweben nur noch in der Plazenta nachzuweisen [Dear et al., 1997; Dear et al., 1999]. Man vermutet daher, dass es in die Zelldifferenzierung involviert ist. Funktionelle Aufgaben wurden bisher wenige identifiziert, aber eine Rolle bei der Stabilisierung von Mikrotubuli und der Organisation des Zytoskeletts wurde beschrieben [Tonami et al., 2007]. Da es auch eine Kalziumbindestelle besitzt, könnte man vermuten, dass bei einer Interaktion mit TRPV5 das aufgenommene Kalzium von Calpain-6 gebunden und dieses dadurch aktiviert wird, um andere regulatorische Aufgaben im Bereich des Zytoskeletts nahe der Zellmembran auszuüben, möglicherweise eine Verknüpfung von TRPV5 mit dem Zytoskelett

herstellt. Dass TRP Kanäle an der Regulation von Calpainen beteiligt sind, wurde für TRPM7 gezeigt, welches durch lokale Erhöhung der Kalziumkonzentration die Proteaseaktivität von Calpain-2 aktiviert, was die Zelladhäsion beeinflusst [Su et al., 2006]. Ein gleicher Mechanismus wäre für TRPV5 und Calpain-6 auch zur Regulation der Zytoskelett-Organisation denkbar. Andere Calpaine sind an der Auslösung eines Apoptose-ähnlichen Zelltods in Brustkrebszellen nach Behandlung mit aktivem Vitamin D beteiligt [Mathiasen et al., 2002]. Die Auslösung der Apoptose ist in der Plazenta ein Prozess, der eher kontraproduktiv wäre, da ein schnelles, invasives Wachstum dieses Gewebes von großer Bedeutung für den Entwicklungsprozess ist. In dieser Hinsicht weist die Plazenta viele Parallelen zum tumorartigen Wachstum auf. Da Calpain-6, abgesehen von der Embryonalphase, nur in der Plazenta exprimiert wird, könnte seine regulatorische Funktion in der Plazenta die Inhibierung der Apoptose sein. Von Rho und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass Calpain-6 sowohl die Apoptose inhibiert als auch die Angiogenese erleichtert [Rho et al., 2008]. Beides sind wichtige Eigenschaften von Tumoren aber auch für die Plazenta, um diese ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen. Da Calpain-6 keine Proteaseaktivität mehr besitzt, die bei anderen Calpainen wichtig ist zur Auslösung der Apoptose, könnte man spekulieren, dass dies den entscheidenden Unterschied ausmacht. Außer der nicht vorhandenen katalytischen Domäne, ist die Homologie zu den anderen Calpainen noch vorhanden, auch die definierten Bereiche zur Bindung von Kalzium [Croall et al., 2007; Khorchid et al., 2002], so dass es mit den anderen Calpainen um die Cofaktoren oder Substrate konkurriert, deren Aktivität vermindert und so möglicherweise das Wachstum der Plazenta begünstigt. Weitere Untersuchungen zur Assoziation und Funktion von Calpain-6 mit dem TRPV5 Protein müssten aber zunächst mit zusätzlichen unabhängigen Methoden erfolgen.

Jedes dieser drei beschriebenen Proteine, 11 β -HSD2, Ku70 und Calpain-6 ist in zelluläre Differenzierungsprozesse verwickelt und eine Interaktion mit TRPV5 wurde in Pulldown-Experimenten mit dem N- und C-terminalen Fusionsprotein über Massenspektrometrie und in Western Blots nachgewiesen. Neben einer reinen Kalziumtransportfunktion könnte TRPV5 also in der Plazenta noch weitere Aufgaben erfüllen, die mit der Zelldifferenzierung in Zusammenhang stehen. Zudem könnte dies die Lokalisation von TRPV5 im Zytoplasma und der Basolateralmembran des STB oder auch den extravillösen Trophoblasten in der Plazenta erklären. Die drei diskutierten Proteine sind alle viel versprechend in Bezug auf eine

Interaktion mit TRPV5, nicht nur in der Plazenta, und sollten in weiteren Versuchen wie Coimmunpräzipitation und Immunhistochemie näher charakterisiert werden.

6 Zusammenfassung

Der TRPV5 Ionenkanal ist ein hoch selektiver Kalziumkanal, der in der Niere exprimiert wird und dort für den transzellulären Kalziumtransport im distalen Konvolut verantwortlich ist. TRPV5 Transkripte sind auch in anderen Geweben, wie z.B. der Plazenta, identifiziert worden. In dieser Arbeit wurde versucht, das TRPV5 Protein in verschiedenen Geweben nachzuweisen und den Kanal sowie eventuell daran assoziierte Proteine aus der Plazenta zu isolieren. Hierzu wurden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurden vier polyklonale Peptidantikörper generiert, einer gegen einen N- und drei gegen C-terminale Bereiche des humanen TRPV5 Proteins. Diese wurden eingehend mittels ELISA, Peptidblot-Analysen, Western Blot Analysen und immunhistochemischen Färbungen bezüglich ihrer Spezifität und Affinität charakterisiert. Alle generierten Antikörper erkennen spezifisch nur die antigenen Bindungsregionen in Glutathion-S-Transferase (GST)-TRPV5-Fusionsproteinen und detektieren das endogen in humaner Plazenta exprimierte Protein. Der Antikörper, der gegen den absoluten C-Terminus des TRPV5 Ionenkanals gerichtet ist (982/3), erwies sich zum Nachweis des TRPV5 Proteins im distalen Konvolut in Mausnieren als geeignet, allerdings zum Nachweis des TRPV5 Proteins im Synzytiotrophoblasten der humanen Plazenta, ist einer der anderen C-terminalen TRPV5 Antikörper besser geeignet. Der Antikörper 982/3 wurde auch in Immunpräzipitationen und Antikörper-Affinitätschromatographien eingesetzt. Mit diesen beiden Methoden konnte das TRPV5 zwar in kleinen Mengen aus humanem Plazentagewebe bzw. Mausnieregewebe angereichert und im anschließenden Western Blot detektiert werden, allerdings war die Menge des isolierten Proteins so gering, dass eine massenspektrometrische Identifikation nicht möglich war. Parallel wurden GST-Pulldown Versuche mit Fusionsproteinen, die den N- und C-Terminus des TRPV5 Proteins enthalten, mit Proteinextrakten der humanen Plazenta durchgeführt. Hierbei wurden insgesamt 38 Proteine als putative Interaktionspartner von TRPV5 identifiziert. Darunter befinden sich bereits in der Literatur beschriebene Interaktionspartner, wie NHERF2 und Galectin-1, und zahlreiche potentielle TRPV5 bindende Proteine. Zu den häufigsten identifizierten Proteinen zählen die Proteine 11 β -HSD2, Ku70 und Calpain-6. Ihre Bindung an N- und C-terminale Bereiche des Ionenkanals, nicht aber an GST konnte in weiteren GST-Pulldown-Experimenten und anschließender Identifikation im Western Blot bestätigt werden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das TRPV5 Protein in der humanen Plazenta an der Blut-Plazenta Schranke exprimiert wird. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist dort das Protein mit anderen Proteinen assembliert. Inwiefern diese Interaktionen die Kanalaktivität beeinflussen müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aebersold, R., Mann, M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**: 198-207
- Akashi, H., Han, H.J., Iizaka, M., Nakajima, Y., Furukawa, Y., Sugano, S., Imai, K., Nakamura, Y. (2000): Isolation and characterization of a novel gene encoding a putative seven-span transmembrane protein, TM7SF3. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**: 305-309
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2001): Lehrbuch der Molekulare Zellbiologie.
- Andrade, Y.N., Fernandes, J., Lorenzo, I.M., Arniges, M., Valverde, M.A. (2007): The TRPV4 Channel in Ciliated Epithelia.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J., Karin, M. (1997): Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* **17**: 3094-3102
- Beaufay, H., mar-Costesec, A., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., Berthet, J. (1974): Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. 3. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients. *J. Cell Biol.* **61**: 213-231
- Belkacemi, L., Bedard, I., Simoneau, L., Lafond, J. (2005): Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium* **37**: 1-8
- Benediktsson, R., Lindsay, R.S., Noble, J., Seckl, J.R., Edwards, C.R. (1993): Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* **341**: 339-341
- Bera, T.K., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Sathyanarayana, B.K., Kumar, V., Lee, B., Pastan, I. (2002): POTE, a highly homologous gene family located on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**: 16975-16980
- Bernucci, L., Henriquez, M., Diaz, P., Riquelme, G. (2006): Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane. *Placenta* **27**: 1082-1095
- Berti, P.J., Storer, A.C. (1995): Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* **246**: 273-283
- Biner, H.L., rpin-Bott, M.P., Loffing, J., Wang, X., Knepper, M., Hebert, S.C., Kaissling, B. (2002): Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**: 836-847
- Birnbaumer, L., Yildirim, E., Abramowitz, J. (2003): A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium* **33**: 419-432
- Blum, P., Velligan, M., Lin, N., Matin, A. (1992): DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Biotechnology (N.Y.)* **10**: 301-304
- Boros, S., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2009): Active Ca(2+) reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Arch.* **458**: 99-109
- Boyd, R.D. (1987): Placental transport: diversity and complexity. *Arch. Dis. Child* **62**: 1205-1206
- Braslau, D.L., Ringo, D.L., Rocha, V. (1984): Synthesis of novel calcium-dependent proteins associated with mammary epithelial cell migration and differentiation. *Exp. Cell Res.* **155**: 213-221

- Brown, R.W., Chapman, K.E., Edwards, C.R., Seckl, J.R. (1993): Human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* **132**: 2614-2621
- Brown, R.W., Chapman, K.E., Kotelevtsev, Y., Yau, J.L., Lindsay, R.S., Brett, L., Leckie, C., Murad, P., Lyons, V., Mullins, J.J., Edwards, C.R., Seckl, J.R. (1996): Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Biochem.J.* **313 (Pt 3)**: 1007-1017
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G. (2004): Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327-1333
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824
- Cha, S.K., Huang, C.L. (2010): WNK4 kinase stimulates caveola-mediated endocytosis of TRPV5 amplifying the dynamic range of regulation of the channel by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* **285**: 6604-6611
- Cha, S.K., Ortega, B., Kurosu, H., Rosenblatt, K.P., Kuro, O., Huang, C.L. (2008): Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**: 9805-9810
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., Rhee, S.G. (1999): Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res.Clin.Pract.* **45**: 101-112
- Chan, J.Y., Lerman, M.I., Prabhakar, B.S., Isozaki, O., Santisteban, P., Kuppens, R.C., Oates, E.L., Notkins, A.L., Kohn, L.D. (1989): Cloning and characterization of a cDNA that encodes a 70-kDa novel human thyroid autoantigen. *J.Biol.Chem.* **264**: 3651-3654
- Chang, Q., Gyftogianni, E., van de Graaf, S.F., Hoefs, S., Weidema, F.A., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2004): Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J.Biol.Chem.* **279**: 54304-54311
- Chang, Q., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Topala, C.N., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2005): The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* **310**: 490-493
- Chattopadhyay, N., Mithal, A., Brown, E.M. (1996): The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr.Rev.* **17**: 289-307
- Choi, E.K., Lee, Y.H., Choi, Y.S., Kwon, H.M., Choi, M.S., Ro, J.Y., Park, S.K., Yu, E. (2002): Heterogeneous expression of Ku70 in human tissues is associated with morphological and functional alterations of the nucleus. *J.Pathol.* **198**: 121-130
- Clapham, D.E. (1995): Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* **375**: 634-635
- Clarson, L.H., Glazier, J.D., Greenwood, S.L., Jones, C.J., Sides, M.K., Sibley, C.P. (1996): Activity and expression of Na(+)-K(+)-ATPase in human placental cytotrophoblast cells in culture. *J.Physiol* **497 (Pt 3)**: 735-743
- Colbert, H.A., Smith, T.L., Bargmann, C.I. (1997): OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J.Neurosci.* **17**: 8259-8269
- Costanzo, L.S., Windhager, E.E., Ellison, D.H. (2000): Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. 1978. *J.Am.Soc.Nephrol.* **11**: 1562-1580

- Croall, D.E., Ersfeld, K. (2007): The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol.* **8**: 218-
- de Groot, T., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2008): TRPV5: an ingeniously controlled calcium channel. *Kidney Int.* **74**: 1241-1246
- de Groot, T., Lee, K., Langeslag, M., Xi, Q., Jalink, K., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2009): Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. *J.Am.Soc.Nephrol.* **20**: 1693-1704
- Dear, N., Matena, K., Vingron, M., Boehm, T. (1997): A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* **45**: 175-184
- Dear, T.N., Boehm, T. (1999): Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. *Mech.Dev.* **89**: 201-209
- Demarchi, F., Schneider, C. (2007): The calpain system as a modulator of stress/damage response. *Cell Cycle* **6**: 136-138
- den Dekker, E., Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2003): The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* **33**: 497-507
- den Dekker, E., Schoeber, J., Topala, C.N., van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2005): Characterization of a Madin-Darby canine kidney cell line stably expressing TRPV5. *Pflugers Arch.* **450**: 236-244
- Eaton, B.M., Yudilevich, D.L. (1981): Uptake and asymmetric efflux of amino acids at maternal and fetal sides of placenta. *Am.J.Physiol* **241**: C106-C112
- Edwards, H.C., Booth, A.G. (1987): Calcium-sensitive, lipid-binding cytoskeletal proteins of the human placental microvillar region. *J.Cell Biol.* **105**: 303-311
- Embark, H.M., Setiawan, I., Poppendieck, S., van de Graaf, S.F., Boehmer, C., Palmada, M., Wieder, T., Gerstberger, R., Cohen, P., Yun, C.C., Bindels, R.J., Lang, F. (2004): Regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem.* **14**: 203-212
- Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Niemeyer, B.A. (2004): Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J.Biol.Chem.* **279**: 34456-34463
- Faulk, W.P., McIntyre, J.A. (1983): Immunological studies of human trophoblast: markers, subsets and functions. *Immunol.Rev.* **75**: 139-175
- Fields, S., Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Fischer, B., Sumner, I., Goodenough, P. (1993): Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol.Bioeng.* **41**: 3-13
- Flockerzi, V. (2007): An introduction on TRP channels. *Handb.Exp.Pharmacol.* 1-19
- Fomina, A.F., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Cahalan, M.D. (2003): Regulation of membrane trafficking and subcellular organization of endocytic compartments revealed with FM1-43 in resting and activated human T cells. *Exp.Cell Res.* **291**: 150-166

- Friedman, P.A. (1999): Calcium transport in the kidney. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **8**: 589-595
- Friedman, P.A. (1988): Basal and hormone-activated calcium absorption in mouse renal thick ascending limbs. *Am.J.Physiol* **254**: F62-F70
- Gaunt, M., Ockleford, C.D. (1986): Microinjection of human placenta. II: Biological application. *Placenta* **7**: 325-331
- Georgopoulos, C. (2006): Toothpicks, serendipity and the emergence of the Escherichia coli DnaK (Hsp70) and GroEL (Hsp60) chaperone machines. *Genetics* **174**: 1699-1707
- Gerke, V., Moss, S.E. (2002): Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* **82**: 331-371
- Gertner, J.M., Coustan, D.R., Kliger, A.S., Mallette, L.E., Ravin, N., Broadus, A.E. (1986): Pregnancy as state of physiologic absorptive hypercalciuria. *Am.J.Med.* **81**: 451-456
- Gkika, D., Mahieu, F., Nilius, B., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2004): 80K-H as a new Ca²⁺ sensor regulating the activity of the epithelial Ca²⁺ channel transient receptor potential cation channel V5 (TRPV5). *J.Biol.Chem.* **279**: 26351-26357
- Gkika, D., Topala, C.N., Chang, Q., Picard, N., Thebault, S., Houillier, P., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006a): Tissue kallikrein stimulates Ca²⁺ reabsorption via PKC-dependent plasma membrane accumulation of TRPV5. *EMBO J.* **25**: 4707-4716
- Gkika, D., Topala, C.N., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006b): The immunophilin FKBP52 inhibits the activity of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **290**: F1253-F1259
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J. (2003): The calpain system. *Physiol Rev.* **83**: 731-801
- Graumann, J., Dunipace, L.A., Seol, J.H., McDonald, W.H., Yates, J.R., III, Wold, B.J., Deshaies, R.J. (2004): Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol.Cell Proteomics.* **3**: 226-237
- Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der, S.N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K., Stanhope-Baker, P., Schlissel, M.S., Roth, D.B., Alt, F.W. (1997): Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity.* **7**: 653-665
- Guan, K.L., Dixon, J.E. (1991): Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal.Biochem.* **192**: 262-267
- Gunthorpe, M.J., Benham, C.D., Randall, A., Davis, J.B. (2002): The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol.Sci.* **23**: 183-191
- Handsuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., Fournier, T. (2007): Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology* **148**: 5011-5019
- Harder, T., Thiel, C., Gerke, V. (1993): Formation of the annexin IIp112 complex upon differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *J.Cell Sci.* **104 (Pt 4)**: 1109-1117
- Hardie, R.C., Minke, B. (1992): The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* **8**: 643-651

- Hardy, D.B., Dixon, S.J., Narayanan, N., Yang, K. (2001): Calcium inhibits human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **283**: 756-761
- Hardy, D.B., Pereria, L.E., Yang, K. (1999): Prostaglandins and leukotriene B4 are potent inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Biol.Reprod.* **61**: 40-45
- Harlow, E., Lane, D. (1988): Antibodies - a laboratory manual.
- Hefferin, M.L., Tomkinson, A.E. (2005): Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**: 639-648
- Helenius, A., Aebi, M. (2001): Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. (2005): Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J.Cell Sci.* **118**: 917-928
- Hewitt, D.P., Mark, P.J., Waddell, B.J. (2006a): Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology* **147**: 5568-5574
- Hewitt, D.P., Mark, P.J., Waddell, B.J. (2006b): Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptors in rat pregnancy and the effect of increased glucocorticoid exposure. *Biol.Reprod.* **74**: 23-28
- Hill, E.P., Longo, L.D. (1980): Dynamics of maternal-fetal nutrient transfer. *Fed.Proc.* **39**: 239-244
- Hirasawa, G., Sasano, H., Takahashi, K., Fukushima, K., Suzuki, T., Hiwatashi, N., Toyota, T., Krozowski, Z.S., Nagura, H. (1997): Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**: 3859-3863
- Hirnet, D., Olausson, J., Fecher-Trost, C., Bodding, M., Nastainczyk, W., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Freichel, M. (2003): The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* **33**: 509-518
- Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2008): Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology.(Bethesda.)* **23**: 32-40
- Hoenderop, J.G., Dardenne, O., van, A.M., van der Kemp, A.W., van Os, C.H., Arnaud, R., Bindels, R.J. (2002a): Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase knockout mice. *FASEB J.* **16**: 1398-1406
- Hoenderop, J.G., Hartog, A., Stuiver, M., Doucet, A., Willems, P.H., Bindels, R.J. (2000): Localization of the epithelial Ca(2+) channel in rabbit kidney and intestine. *J.Am.Soc.Nephrol.* **11**: 1171-1178
- Hoenderop, J.G., Muller, D., van der Kemp, A.W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P.H., van Os, C.H., Bindels, R.J. (2001a): Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**: 1342-1349
- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2005): Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* **85**: 373-422
- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2003a): Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation. *Pflugers Arch.* **446**: 304-308

- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2002b): Molecular mechanism of active Ca²⁺ reabsorption in the distal nephron. *Annu.Rev.Physiol* **64**: 529-549
- Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Hartog, A., van de Graaf, S.F., van Os, C.H., Willems, P.H., Bindels, R.J. (1999): Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia. *J.Biol.Chem.* **274**: 8375-8378
- Hoenderop, J.G., van Leeuwen, J.P., van der Eerden, B.C., Kersten, F.F., van der Kemp, A.W., Merillat, A.M., Waarsing, J.H., Rossier, B.C., Vallon, V., Hummler, E., Bindels, R.J. (2003b): Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J.Clin.Invest* **112**: 1906-1914
- Hoenderop, J.G., Vennekens, R., Muller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R.J., Nilius, B. (2001b): Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J.Physiol* **537**: 747-761
- Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., Bindels, R.J. (2003c): Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* **22**: 776-785
- Hofmann, B., Hecht, H.J., Flohe, L. (2002): Peroxiredoxins. *Biol.Chem.* **383**: 347-364
- Holmes, M.C., Abrahamsen, C.T., French, K.L., Paterson, J.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R. (2006): The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *J.Neurosci.* **26**: 3840-3844
- Hopp, T.P., Woods, K.R. (1981): Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**: 3824-3828
- Hopp, T.P., Woods, K.R. (1983): A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol.Immunol.* **20**: 483-489
- Janssen, S.W., Hoenderop, J.G., Hermus, A.R., Sweep, F.C., Martens, G.J., Bindels, R.J. (2002): Expression of the novel epithelial Ca²⁺ channel ECaC1 in rat pancreatic islets. *J.Histochem.Cytochem.* **50**: 789-798
- Jeffery, C.J. (1999): Moonlighting proteins. *Trends Biochem.Sci.* **24**: 8-11
- Jia, D., O'Brien, C.A., Stewart, S.A., Manolagas, S.C., Weinstein, R.S. (2006): Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology* **147**: 5592-5599
- Jiang, Y., Ferguson, W.B., Peng, J.B. (2007): WNK4 enhances TRPV5-mediated calcium transport: potential role in hypercalciuria of familial hyperkalemic hypertension caused by gene mutation of WNK4. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **292**: F545-F554
- Jimenez, V., Henriquez, M., Llanos, P., Riquelme, G. (2004): Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. a comparative study. *Placenta* **25**: 422-437
- Johansson, M., Jansson, T., Powell, T.L. (2000): Na(+)-K(+)-ATPase is distributed to microvillous and basal membrane of the syncytiotrophoblast in human placenta. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **279**: R287-R294
- Johnsson, N., Varshavsky, A. (1994): Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 10340-10344

- Kaboord, B., Perr, M. (2008): Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol.Biol.* **424**: 349-364
- Kaczan-Bourgois, D., Salles, J.P., Hullin, F., Fauvel, J., Moisand, A., Duga-Neulat, I., Berrebi, A., Campistron, G., Chap, H. (1996): Increased content of annexin II (p36) and p11 in human placenta brush-border membrane vesicles during syncytiotrophoblast maturation and differentiation. *Placenta* **17**: 669-676
- Käfer, V. (2009): Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen. *Bachelorarbeit*
- Kemp, B., Kertschanska, S., Kadyrov, M., Rath, W., Kaufmann, P., Huppertz, B. (2002): Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem.Cell Biol.* **117**: 401-414
- Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.C., Stines, A.P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M., Hartl, F.U. (2005): Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* **122**: 209-220
- Kersey, P.J., Duarte, J., Williams, A., Karavidopoulou, Y., Birney, E., Apweiler, R. (2004): The International Protein Index: an integrated database for proteomics experiments. *Proteomics.* **4**: 1985-1988
- Keryer, G., Alsat, E., Tasken, K., Evain-Brion, D. (1998): Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J.Cell Sci.* **111 (Pt 7)**: 995-1004
- Khanal, R.C., Nemere, I. (2008): Endocrine regulation of calcium transport in epithelia. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **35**: 1277-1287
- Khanna, R., Myers, M.P., Laine, M., Papazian, D.M. (2001): Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **276**: 34028-34034
- Khorchid, A., Ikura, M. (2002): How calpain is activated by calcium. *Nat.Struct.Biol.* **9**: 239-241
- Koike, M. (2002): Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J.Radiat.Res.(Tokyo)* **43**: 223-236
- Kossintseva, I., Wong, S., Johnstone, E., Guilbert, L., Olson, D.M., Mitchell, B.F. (2006): Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity through Ca²⁺ and cAMP pathways. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **290**: E282-E288
- Kovacs, C.S., Manley, N.R., Moseley, J.M., Martin, T.J., Kronenberg, H.M. (2001): Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium transport. *J.Clin.Invest* **107**: 1007-1015
- Kovalevskaya, G., Genbacev, O., Fisher, S.J., Caceres, E., O'Connor, J.F. (2002): Trophoblast origin of hCG isoforms: cytotrophoblasts are the primary source of choriocarcinoma-like hCG. *Mol.Cell Endocrinol.* **194**: 147-155
- Krozowski, Z., Maguire, J.A., Stein-Oakley, A.N., Dowling, J., Smith, R.E., Andrews, R.K. (1995): Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **80**: 2203-2209
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., Nabeshima, Y.I. (1997): Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**: 45-51

- Labeta, M.O., Margni, R.A., Leoni, J., Binaghi, R.A. (1986): Structure of asymmetric non-precipitating antibody: presence of a carbohydrate residue in only one Fab region of the molecule. *Immunology* **57**: 311-317
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lafond, J., Simoneau, L. (2006): Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins. *Int.Rev.Cytol.* **250**: 109-174
- Lakshmi, V., Nath, N., Muneyyirci-Delale, O. (1993): Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: evidence for the existence of two species of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **45**: 391-397
- Lambers, T.T., Oancea, E., de, G.T., Topala, C.N., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2007): Extracellular pH dynamically controls cell surface delivery of functional TRPV5 channels. *Mol.Cell Biol.* **27**: 1486-1494
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., McCoy, J.M. (1993): A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N.Y.)* **11**: 187-193
- Lee, J., Cha, S.K., Sun, T.J., Huang, C.L. (2005): PIP2 activates TRPV5 and releases its inhibition by intracellular Mg²⁺. *J.Gen.Physiol* **126**: 439-451
- Lennon, N.J., Kho, A., Bacskai, B.J., Perlmutter, S.L., Hyman, B.T., Brown, R.H., Jr. (2003): Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J.Biol.Chem.* **278**: 50466-50473
- Lepage, P.K., Boulay, G. (2007): Molecular determinants of TRP channel assembly. *Biochem.Soc.Trans.* **35**: 81-83
- Liggins, G.C. (1994): The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod.Fertil.Dev.* **6**: 141-150
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R., III (1999): Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat.Biotechnol.* **17**: 676-682
- Loffing, J., Loffing-Cueni, D., Valderrabano, V., Klausli, L., Hebert, S.C., Rossier, B.C., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Kaissling, B. (2001): Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **281**: F1021-F1027
- Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2008): The {beta}-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol.Dial.Transplant.*
- Lynch, E.M., Moreland, R.B., Ginis, I., Perrine, S.P., Faller, D.V. (2001): Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **280**: C897-C911
- Malassine, A., Cronier, L. (2002): Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine.* **19**: 3-11
- Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roques, P., Barre-Sinoussi, F., Chaouat, G. (2004): Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* **286**: 21-34

- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr. (1989): Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal.Biochem.* **180**: 195-204
- Manevich, Y., Feinstein, S.I., Fisher, A.B. (2004): Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 3780-3785
- Marin, R., Riquelme, G., Godoy, V., Diaz, P., Abad, C., Caires, R., Proverbio, T., Pinero, S., Proverbio, F. (2008): Functional and Structural Demonstration of the Presence of Ca-ATPase (PMCA) in Both Microvillous and Basal Plasma Membranes from Syncytiotrophoblast of Human Term Placenta. *Placenta* **29**: 671-679
- Mathiasen, I.S., Sergeev, I.N., Bastholm, L., Elling, F., Norman, A.W., Jaattela, M. (2002): Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* **277**: 30738-30745
- McLaughlin, P.J., Gee, H., Johnson, P.M. (1983): Placental-type alkaline phosphatase in pregnancy and malignancy plasma: specific estimation using a monoclonal antibody in a solid phase enzyme immunoassay. *Clin.Chim.Acta* **130**: 199-209
- Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S., Homma, M. (1981): Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J.Clin.Invest* **68**: 611-620
- Moffett, A., Loke, C. (2006): Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat.Rev.Immunol.* **6**: 584-594
- Monferran, S., Muller, C., Mourey, L., Frit, P., Salles, B. (2004a): The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin. *J.Mol.Biol.* **337**: 503-511
- Monferran, S., Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., Muller, C. (2004b): The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J.* **23**: 3758-3768
- Montell, C. (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Sci.STKE* **2005**: re3-
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G., Shimizu, N., Zhu, M.X. (2002): A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol.Cell* **9**: 229-231
- Montell, C., Rubin, G.M. (1989): Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**: 1313-1323
- Moreau, R., Daoud, G., Bernatchez, R., Simoneau, L., Masse, A., Lafond, J. (2002a): Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta. *Biochim.Biophys.Acta* **1564**: 325-332
- Moreau, R., Hamel, A., Daoud, G., Simoneau, L., Lafond, J. (2002b): Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta. *Biol.Reprod.* **67**: 1473-1479
- Muller, C., Paupert, J., Monferran, S., Salles, B. (2005): The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. *Cell Cycle* **4**: 438-441
- Muller, D., Hoenderop, J.G., Meij, I.C., van den Heuvel, L.P., Knoers, N.V., den Hollander, A.I., Eggert, P., Garcia-Nieto, V., Claverie-Martin, F., Bindels, R.J. (2000a): Molecular cloning, tissue

- distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECaC1). *Genomics* **67**: 48-53
- Muller, D., Hoenderop, J.G., Merckx, G.F., van Os, C.H., Bindels, R.J. (2000b): Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **275**: 47-52
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **51 Pt 1**: 263-273
- Munro, H.N., Pilistine, S.J., Fant, M.E. (1983): The placenta in nutrition. *Annu.Rev.Nutr.* **3**: 97-124
- Naciff, J.M., Behbehani, M.M., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. (1996): Annexin VI modulates Ca²⁺ and K⁺ conductances of spinal cord and dorsal root ganglion neurons. *Am.J.Physiol* **271**: C2004-C2015
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (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**: 255-262
- Niemeyer, B.A., Bergs, C., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Trost, C. (2001): Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 3600-3605
- Nijenhuis, T., Renkema, K.Y., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006): Acid-base status determines the renal expression of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport proteins. *J.Am.Soc.Nephrol.* **17**: 617-626
- Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Droogmans, G. (2001a): Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca²⁺. *Cell Calcium* **29**: 417-428
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Droogmans, G. (2000): Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca²⁺ channel ECaC. *J.Physiol* **527 Pt 2**: 239-248
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Droogmans, G., Bindels, R.J. (2001b): The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. *J.Biol.Chem.* **276**: 1020-1025
- Nilius, B., Weidema, F., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Vennekens, R., Hoefs, S., Droogmans, G., Bindels, R.J. (2003): The carboxyl terminus of the epithelial Ca(2+) channel ECaC1 is involved in Ca(2+)-dependent inactivation. *Pflugers Arch.* **445**: 584-588
- Palmada, M., Poppendieck, S., Embark, H.M., van de Graaf, S.F., Boehmer, C., Bindels, R.J., Lang, F. (2005): Requirement of PDZ domains for the stimulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Cell Physiol Biochem.* **15**: 175-182
- Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., Muller, C. (2007): Transport of the leaderless protein Ku on the cell surface of activated monocytes regulates their migratory abilities. *EMBO Rep.* **8**: 583-588
- Peng, J.B., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2001): Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels. *Genomics* **76**: 99-109
- Peng, J.B., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2003): Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci.* **18**: 158-163

- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2000a): A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J.Biol.Chem.* **275**: 28186-28194
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Weremowicz, S., Morton, C.C., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2000b): Human calcium transport protein CaT1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **278**: 326-332
- Pepe, G.J., Albrecht, E.D. (1995): Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr.Rev.* **16**: 608-648
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., Vulpe, C.D. (2008): Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics.* **8**: 1744-1749
- Prabhakar, B.S., Allaway, G.P., Srinivasappa, J., Notkins, A.L. (1990): Cell surface expression of the 70-kD component of Ku, a DNA-binding nuclear autoantigen. *J.Clin.Invest* **86**: 1301-1305
- Prouty, W.F., Goldberg, A.L. (1972): Fate of abnormal proteins in E. coli accumulation in intracellular granules before catabolism. *Nat.New Biol.* **240**: 147-150
- Qiu, A., Hogstrand, C. (2004): Functional characterisation and genomic analysis of an epithelial calcium channel (ECaC) from pufferfish, *Fugu rubripes*. *Gene* **342**: 113-123
- Rambotti, M.G., Spreca, A., Donato, R. (1993): Immunocytochemical localization of annexins V and VI in human placenta of different gestational ages. *Cell Mol.Biol.Res.* **39**: 579-588
- Rehm, H. (2006): Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. **5. Auflage**:
- Reilly, R.F., Ellison, D.H. (2000): Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev.* **80**: 277-313
- Renaud-Young, M., Gallin, W.J. (2002): In the first extracellular domain of E-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved His-Ala-Val motif, are required for adhesion. *J.Biol.Chem.* **277**: 39609-39616
- Renkema, K.Y., Nijenhuis, T., van der Eerden, B.C., van der Kemp, A.W., Weinans, H., van Leeuwen, J.P., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2005): Hypervitaminosis D mediates compensatory Ca²⁺ hyperabsorption in TRPV5 knockout mice. *J.Am.Soc.Nephrol.* **16**: 3188-3195
- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F., Lewit-Bentley, A. (1999): The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat.Struct.Biol.* **6**: 89-95
- Rho, S.B., Byun, H.J., Park, S.Y., Chun, T. (2008): Calpain 6 supports tumorigenesis by inhibiting apoptosis and facilitating angiogenesis. *Cancer Lett.* **271**: 306-313
- Ruth, P., Flockerzi, V., von, N.E., Oeken, J., Hofmann, F. (1985): Characterization of the binding sites for nimodipine and (-)-desmethoxyverapamil in bovine cardiac sarcolemma. *Eur.J.Biochem.* **150**: 313-322
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Edition 1-3).
- Sato, K., Chisaka, H., Okamura, K., Challis, J.R. (2008): Effect of the interaction between lipoxygenase pathway and progesterone on the regulation of hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase 2 in cultured human term placental trophoblasts. *Biol.Reprod.* **78**: 514-520

- Schafer, W.R., Zahradnik, H.P., Arbogast, E., Wetzka, B., Werner, K., Breckwoldt, M. (1996): Arachidonate metabolism in human placenta, fetal membranes, decidua and myometrium: lipoxygenase and cytochrome P450 metabolites as main products in HPLC profiles. *Placenta* **17**: 231-238
- Schalkowsky, P. (2009): Untersuchung von affinitätsgereinigten Membranproteinkomplexen mittels Blue-Native-Gelelektrophorese und "Tube-Gel Digestion".
- Schindl, R., Romanin, C. (2007): Assembly domains in TRP channels. *Biochem.Soc.Trans.* **35**: 84-85
- Schmidt, R.F. (2000): Physiologie des Menschen. **28. Auflage**:
- Schoeber, J.P., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2007): Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6. *Biochem.Soc.Trans.* **35**: 115-119
- Schwalbe, R.A., Wang, Z., Wible, B.A., Brown, A.M. (1995): Potassium channel structure and function as reported by a single glycosylation sequon. *J.Biol.Chem.* **270**: 15336-15340
- Seißler, N. (2008): Untersuchung von Membranproteinkomplexen in humaner Plazenta. *Diplomarbeit*
- Shams, M., Kilby, M.D., Somerset, D.A., Howie, A.J., Gupta, A., Wood, P.J., Afnan, M., Stewart, P.M. (1998): 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum.Reprod.* **13**: 799-804
- Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V., Lin, J. (1993): Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* **132**: 1387-1395
- Sibley, C.P. (2009): Understanding placental nutrient transfer--why bother? New biomarkers of fetal growth. *J.Physiol* **587**: 3431-3440
- Smith, C.H., Moe, A.J., Ganapathy, V. (1992): Nutrient transport pathways across the epithelium of the placenta. *Annu.Rev.Nutr.* **12**: 183-206
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150**: 76-85
- Stewart, P.M., Rogerson, F.M., Mason, J.I. (1995): Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **80**: 885-890
- Stumpf, T., Zhang, Q., Hirnet, D., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Wissenbach, U., Dorr, J., Lohr, C., Deitmer, J.W., Fecher-Trost, C. (2008): The human TRPV6 channel protein is associated with cyclophilin B in human placenta. *J.Biol.Chem.* **283**: 18086-18098
- Su, L.T., Agapito, M.A., Li, M., Simonson, W.T., Huttenlocher, A., Habas, R., Yue, L., Runnels, L.W. (2006): TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain. *J.Biol.Chem.* **281**: 11260-11270
- Sun, K., Adamson, S.L., Yang, K., Challis, J.R. (1999): Interconversion of cortisol and cortisone by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and 2 in the perfused human placenta. *Placenta* **20**: 13-19
- Sun, K., Yang, K., Challis, J.R. (1998): Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone, estrogen, and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts. *Biol.Reprod.* **58**: 1379-1384

- Sutton, R.A., Dirks, J.H. (1975): The renal excretion of calcium: a review of micropuncture data. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **53**: 979-988
- Taniguchi, H., Uenoyama, Y., Miyamoto, Y., Okuda, K. (2002): The lipoxygenase pathways are involved in LH-stimulated progesterone production in bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **67**: 49-60
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B.N., Harris, H.K., Cox, T.C., Massiah, M.A. (2010): Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques* **48**: 61-64
- Teoh, G., Urashima, M., Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., Lee, J.F., Chauhan, D., Ogata, A., Treon, S.P., Anderson, K.C. (1998): The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. *J.Clin.Invest* **101**: 1379-1388
- Tohyama, O., Imura, A., Iwano, A., Freund, J.N., Henrissat, B., Fujimori, T., Nabeshima, Y. (2004): Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J.Biol.Chem.* **279**: 9777-9784
- Tonami, K., Kurihara, Y., Aburatani, H., Uchijima, Y., Asano, T., Kurihara, H. (2007): Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Mol.Cell Biol.* **27**: 2548-2561
- Topala, C.N., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2007): Regulation of the epithelial calcium channel TRPV5 by extracellular factors. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **16**: 319-324
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**: 4350-4354
- Trius, A., Sebranek, J.G. (1996): Carrageenans and their use in meat products. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* **36**: 69-85
- Tsunoda, S., Zuker, C.S. (1999): The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in Drosophila photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium* **26**: 165-171
- Tuteja, R., Tuteja, N. (2000): Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **35**: 1-33
- Ulick, S., Chan, C.K., Rao, K.N., Edassery, J., Mantero, F. (1989): A new form of the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J.Steroid Biochem.* **32**: 209-212
- Ulick, S., Levine, L.S., Gunczler, P., Zanconato, G., Ramirez, L.C., Rauh, W., Rosler, A., Bradlow, H.L., New, M.I. (1979): A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **49**: 757-764
- Vaca, L., Sinkins, W.G., Hu, Y., Kunze, D.L., Schilling, W.P. (1994): Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am.J.Physiol* **267**: C1501-C1505
- van Abel, M., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2005a): The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **371**: 295-306
- van Abel, M., Hoenderop, J.G., Dardenne, O., St, A.R., van Os, C.H., Van Leeuwen, H.J., Bindels, R.J. (2002): 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* **13**: 2102-2109

- van Abel, M., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Friedlaender, M.M., van Leeuwen, J.P., Bindels, R.J. (2005b): Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int.* **68**: 1708-1721
- Van Cromphaut, S.J., Dewerchin, M., Hoenderop, J.G., Stockmans, I., Van, H.E., Kato, S., Bindels, R.J., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G. (2001): Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 13324-13329
- van de Graaf, S.F., Chang, Q., Mensenkamp, A.R., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006a): Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol.Cell Biol.* **26**: 303-312
- van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006b): Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **290**: F1295-F1302
- van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., Bindels, R.J. (2003): Functional expression of the epithelial Ca²⁺ channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* **22**: 1478-1487
- van de Graaf, S.F., Rescher, U., Hoenderop, J.G., Verkaart, S., Bindels, R.J., Gerke, V. (2008): TRPV5 is internalized via clathrin-dependent endocytosis to enter a Ca²⁺-controlled recycling pathway. *J.Biol.Chem.* **283**: 4077-4086
- van de Graaf, S.F., van der Kemp, A.W., van den, B.D., van, O.M., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006c): Identification of BSPRY as a novel auxiliary protein inhibiting TRPV5 activity. *J.Am.Soc.Nephrol.* **17**: 26-30
- van der Eerden, B.C., Hoenderop, J.G., de Vries, T.J., Schoenmaker, T., Buurman, C.J., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A., Bindels, R.J., van Leeuwen, J.P. (2005): The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**: 17507-17512
- Vandre, D.D., Ackerman, W.E., Kniss, D.A., Tewari, A.K., Mori, M., Takizawa, T., Robinson, J.M. (2007): Dysferlin is expressed in human placenta but does not associate with caveolin. *Biol.Reprod.* **77**: 533-542
- Venkatachalam, K., Montell, C. (2007): TRP channels. *Annu.Rev.Biochem.* **76**: 387-417
- Vennekens, R., Hoenderop, J.G., Prenen, J., Stuiver, M., Willems, P.H., Droogmans, G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2000): Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca²⁺ channel. *J.Biol.Chem.* **275**: 3963-3969
- Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Droogmans, G., Nilius, B. (2001): Pore properties and ionic block of the rabbit epithelial calcium channel expressed in HEK 293 cells. *J.Physiol* **530**: 183-191
- Vennekens, R., Voets, T., Bindels, R.J., Droogmans, G., Nilius, B. (2002): Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* **31**: 253-264
- Walhout, A.J., Boulton, S.J., Vidal, M. (2000): Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast* **17**: 88-94
- Wang, J., Yuen, B.H., Leung, P.C. (1989): Stimulation of progesterone and prostaglandin E₂ production by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *FEBS Lett.* **244**: 154-158

- Watanabe, I., Zhu, J., Recio-Pinto, E., Thornhill, W.B. (2004): Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but Not Kv1.1 potassium channels. A pore region determinant dictates the effect of glycosylation on trafficking. *J.Biol.Chem.* **279**: 8879-8885
- Webb, P.D., Mahadevan, L.C. (1987): Calcium-dependant binding proteins associated with human placental syncytiotrophoblast microvillous cytoskeleton. *Biochim.Biophys.Acta* **916**: 288-297
- Weber, K., Erben, R.G., Rump, A., Adamski, J. (2001): Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **289**: 1287-1294
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin, H.J., Poole, L.B. (2003): Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem.Sci.* **28**: 32-40
- Wyrwoll, C.S., Seckl, J.R., Holmes, M.C. (2009): Altered placental function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 knockout mice. *Endocrinology* **150**: 1287-1293
- Xu, H., Fu, Y., Tian, W., Cohen, D.M. (2006): Glycosylation of the osmosensitive transient receptor potential channel TRPV4 on Asn-651 influences membrane trafficking. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **290**: F1103-F1109
- Xu, X.Z., Li, H.S., Guggino, W.B., Montell, C. (1997): Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* **89**: 1155-1164
- Yang, K. (1997): Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids. *Rev.Reprod.* **2**: 129-132
- Yeh, B.I., Kim, Y.K., Jabbar, W., Huang, C.L. (2005): Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons. *EMBO J.* **24**: 3224-3234
- Yeh, B.I., Sun, T.J., Lee, J.Z., Chen, H.H., Huang, C.L. (2003): Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J.Biol.Chem.* **278**: 51044-51052
- Yeh, B.I., Yoon, J., Huang, C.L. (2006): On the role of pore helix in regulation of TRPV5 by extracellular protons. *J.Membr.Biol.* **212**: 191-198
- Yue, L., Peng, J.B., Hediger, M.A., Clapham, D.E. (2001): CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**: 705-709
- Zhang, M.I., O'Neil, R.G. (1999): The diversity of calcium channels and their regulation in epithelial cells. *Adv.Pharmacol.* **46**: 43-83
- Zhang, W., Na, T., Peng, J.B. (2008): WNK3 positively regulates epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 via a kinase-dependent pathway. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **295**: F1472-F1484
- Zhou, M., Veenstra, T.D. (2007): Proteomic analysis of protein complexes. *Proteomics.* **7**: 2688-2697
- Zokas, L., Glenney, J.R., Jr. (1987): The calpactin light chain is tightly linked to the cytoskeletal form of calpactin I: studies using monoclonal antibodies to calpactin subunits. *J.Cell Biol.* **105**: 2111-2121

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 25: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

µg	Mikrogramm	IP	Immunpräzipitation
°C	Grad Celsius	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
µl	Mikroliter	kDa	Kilodalton
A	Absorption	KLH	Keyhole limpet cyanin
Abb.	Abbildung	c	Konzentration
AK	Antikörper	L	Liter
APS	Ammoniumpersulfat	LB	Luria Broth (Medium)
AS	Aminosäure	M	Molar
ATP	Adenosin-trisphosphat	mA	Milliampère
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure	MCS	multiple Klonierungsstelle
bp	Basenpaare	mg	Milligramm
BSA	Rinderserumalbumin	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
bzw.	beziehungsweise	Min	Minute
ca.	circa	ml	Milliliter
CaCl ₂	Kalziumchlorid	mM	millimolar
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
CaT2	Kalziumtransportprotein 2	MW	Molekulargewicht
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	N	Normalität einer Säure
CMC	kritisch mizellare Konzentration	NaCl	Natriumchlorid
Da	Dalton	NaOH	Natriumhydroxid
ddest	doppelt destilliert	NCBI	National Centre for Biotechnology Information
DDM	Dodecyl-β-D-maltosid	NCX1	Natrium-Kalzium-Austauscher
deion	deionisiert	NHS	N-Hydroxy-Succinimid
DMSO	Dimethylsulfoxid	nm	Nanometer
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OD	optische Dichte
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	p.a.	per analysis
DSS	Disuccinimidyl-Suberat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DTT	Dithiothreitol	PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PDZ	Post synaptix density Discs, Zonula occludentes-1
ECaC2	Epithelialer Kalziumkanal 2	PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PKA	Proteinkinase A
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"	PKC	Proteinkinase C
ESI	Elektronenspray-Ionisation	pI	isoelektrischer Punkt
et al.	und andere	PLC	Phospholipase C
g	Gramm	PMCA1b	Plasmamembranäre Kalzium-ATPase 1b
G	Gauche (Kanüledurchmesser)	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
GST	Glutathion-S-Transferase	PNGase F	Peptde:N –Glycosidase F
h	Stunde	ppm	parts per million
H ₂ O	Wasser	PTH	Parathormon
HCl	Salzsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonsäure	RT	Raumtemperatur
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	s	Sekunde
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)	SDS	Natriumdodecylsulfat
		SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
		SPV	Seifen-Protein-Verhältnis

STB	Synzytiotrophoblast	u	Units
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	u.a.	unter anderem
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung	V	Volt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	v/v	volume per volume
TFA	Trifluoressigsäure	VDRE	Vitamin D-Antwortelement
TM	Transmembrandomäne	vgl.	vergleiche
TMB	Tetramethylbenzidin	W	Watt
ToF	Time of Flight, Flugzeit	w/v	weight per volume
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	xg	x-fache der Erdbeschleunigung
TRP	transient receptor potential	z.B.	zum Beispiel
TRPV5		z.T.	zum Teil

8.2 Ergebnislisten und Abbildungen zur ESI-massenspektrometrischen Analyse

Tabelle 26: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie in der kombinierten Suche mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine aus den Pulldown-Experimenten mit dem Protein GST aus Ansätzen mit Plazentahomogenat. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant waren. Der Score ist ab einem Wert von 36 (bzw. Gel 6 35) signifikant.

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
GST Gel2	IPI00455315	38580	927	18	ANXA2 Annexin A2
GST Gel2	IPI00021439	41710	496	17	ACTB Actin, cytoplasmic 1
GST Gel2	IPI00940084	36496	427	17	TPM1 37 kDa protein
GST Gel2	IPI00216134	28730	417	16 (1)	TPM1 tropomyosin 1 alpha chain isoform 7 (oder Isoform 3)
GST Gel2	IPI00848226	35055	316	8	GNB2L1 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
GST Gel2	IPI00910322	17624	277	7 (2)	TPM4 cDNA FLJ52936, weakly similar to Tropomyosin alpha-4 chain
GST Gel2	IPI00010779	17624	277	7 (2)	TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain
GST Gel2	IPI00183968	32930	250	8 (0)	TPM3 tropomyosin 3 isoform 1
GST Gel2	IPI00329389	32708	249	7	RPL6 60S ribosomal protein L6
GST Gel2	IPI00003362	72377	241	13	HSPA5 HSPA5 protein
GST Gel2	IPI00005087	39570	232	3	TMOD3 Tropomodulin-3
GST Gel2	IPI00000494	34341	193	6	RPL5 60S ribosomal protein L5
GST Gel2	IPI00477090	51805	186	3	- Protein
GST Gel2	IPI00013296	17708	180	6	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
GST Gel2	IPI00021428	42024	178	9 (0)	ACTA1 Actin, alpha skeletal muscle
GST Gel2	IPI00005724	45254	173	7	LANCL1 LanC-like protein 1
GST Gel2	IPI00299573	29977	165	9	RPL7A 60S ribosomal protein L7a
GST Gel2	IPI00456758	16551	142	4	RPL27A 60S ribosomal protein L27a
GST Gel2	IPI00218918	38690	142	2 (2)	ANXA1 Annexin A1
GST Gel2	IPI00075248	16827	135	2 (2)	CALM2;CALM1;CALM3;C2orf61 Calmodulin
GST Gel2	IPI00012772	28007	117	4	RPL8 60S ribosomal protein L8
GST Gel2	IPI00005159	44732	110	2 (1)	ACTR2 Actin-related protein 2
GST Gel2	IPI00221089	17212	104	4 (2)	RPS13 40S ribosomal protein S13
GST Gel2	IPI00000891	25004	100	6 (2)	CSH1;CSH2;LOC100293689;GH1 Chorionic somatomammotropin hormone
GST Gel2	IPI00003918	47667	100	1 (1)	RPL4 60S ribosomal protein L4
GST Gel2	IPI00023591	34889	98	2 (2)	PURA Transcriptional activator protein Pur-alpha

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
GST Gel2	IPI00029750	15413	84	2 (2)	RPS24 Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24
GST Gel2	IPI00221093	15540	79	1 (1)	RPS17 40S ribosomal protein S17
GST Gel2	IPI00012119	39722	68	2 (1)	DCN Isoform A of Decorin
GST Gel2	IPI00011253	26671	63	1 (1)	RPS3 40S ribosomal protein S3
GST Gel2	IPI00009342	189134	63	1 (1)	IQGAP1 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1
GST Gel2	IPI00412607	14543	63	1 (1)	RPL35 60S ribosomal protein L35
GST Gel2	IPI00395998	15850	62	3 (1)	RPL32;SNORA7A 60S ribosomal protein L32
GST Gel2	IPI00012750	13734	61	2 (2)	RPS25 40S ribosomal protein S25
GST Gel2	IPI00005613	27854	61	2 (1)	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
GST Gel2	IPI00219155	15788	61	3 (2)	RPL27 60S ribosomal protein L27
GST Gel2	IPI00027547	11277	61	2 (1)	DCD Dermcidin
GST Gel2	IPI00784195	45147	56	2 (1)	CSNK2A1;CSNK2A1P HCG21984 (+ IPI00016613, gleiches Protein) Casein kinase II subunit alpha
GST Gel2	IPI00220327	65999	54	3 (1)	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
GST Gel2	IPI00215888	74560	51	2 (1)	SRP72 Signal recognition particle 72 kDa protein
GST Gel2	IPI00219483	50587	49	2 (1)	SNRNP70 Isoform 2 of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa
GST Gel2	IPI00032258	192650	45	1 (1)	C4A Complement C4-A
GST Gel2	IPI00031556	53467	44	1 (1)	U2AF2 Isoform 1 of Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
GST Gel2	IPI00019359	62027	43	4 (1)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
GST Gel2	IPI00793917	26765	42	2 (1)	KRT8 27 kDa protein
GST Gel2	IPI00018274	134190	40	1 (1)	EGFR Isoform 1 of Epidermal growth factor receptor
GST Gel2	IPI00867509	58910	40	1 (1)	CORO1C Coronin-1C_i3 protein
GST Gel2	IPI00910357		39	1 (1)	- cDNA FLJ57296
GST Gel2	IPI00006034	22478	39	1 (1)	CRIP2 Cysteine-rich protein 2
GST Gel4	IPI00745872	69321	2257	90	ALB Isoform 1 of Serum albumin
GST Gel4	IPI00219757	23341	1747	47	GSTP1 Glutathione S-transferase P
GST Gel4	IPI00455315	38580	148	18	ANXA2 Annexin A2
GST Gel4	IPI00218918	38690	144	10	ANXA1 Annexin A1
GST Gel4	IPI00554498	36288	139	8 (1)	LDHC L-lactate dehydrogenase C chain
GST Gel4	IPI00220327	65999	124	21	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
GST Gel4	IPI00000874	22096	95	6 (2)	PRDX1 Peroxiredoxin-1

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
GST Gel4	IPI00022462	84818	82	4 (1)	TFRC Transferrin receptor protein 1
GST Gel4	IPI00005613	27854	66	4 (1)	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
GST Gel4	IPI00021439	41710	62	9 (2)	ACTB Actin, cytoplasmic 1
GST Gel4	IPI00220834	82652	58	10 (2)	XRCC5 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
GST Gel4	IPI00910275		46	3 (1)	LAD1 Putative uncharacterized protein DKFZp686M21196
GST Gel4	IPI00419585	18001	46	8 (1)	PPIA Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
GST Gel4	IPI00026958		44	3 (1)	FDXR Isoform Short of NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial
GST Gel4	IPI00215914	20684	41	1 (1)	ARF1 ADP-ribosylation factor 1
GST Gel4	IPI00646226	155981	40	3 (1)	MED23 Isoform 5 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
GST Gel4	IPI00647563	22664	38	1 (1)	IRAK1 Protein
GST Gel6	IPI00418169	40386	162	9	ANXA2 annexin A2 isoform 1
GST Gel6	IPI00005724	45254	149	18	LANCL1 LanC-like protein 1
GST Gel6	IPI00246994	42427	78	7 (1)	HSD3B1 Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isom
GST Gel6	IPI00003865	70854	56	9 (2)	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
GST Gel6	IPI00167879		54	1(1)	FLJ36000 Conserved hypothetical protein
GST Gel6	IPI00012011	18491	53	2 (1)	CFL1 Cofilin-1
GST Gel6	IPI00218918	38690	47	6 (0)	ANXA1 Annexin A1
GST Gel6	IPI00910360	18541	45	3 (1)	- cDNA FLJ58927, highly similar to Endoplasmin
GST Gel6	IPI00022463	77000	44	11 (0)	TF Serotransferrin
GST Gel6	IPI00003362	72377	44	8 (1)	HSPA5 HSPA5 protein
GST Gel6	IPI00019359	62027	42	1	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
GST Gel6	IPI00027230	92411	42	11 (0)	HSP90B1 Endoplasmin
GST Gel6	IPI00032139	42376	42	8 (1)	SERPINB9 Serpin B9
GST Gel6	IPI00217963	51236	39	4 (1)	=KRT16 Keratin, type I cytoskeletal 16
GST Gel6	IPI00009865	58818	37	4 (1)	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
GST Gel7	IPI00218918	38690	1014	32	ANXA1 Annexin A1
GST Gel7	IPI00418169	40386	482	27	ANXA2 annexin A2 isoform 1
GST Gel7	IPI00021439	41710	138	12	ACTB Actin, cytoplasmic 1
GST Gel7	IPI00000875	56114	123	11	TUT1;EEF1G cDNA FLJ56389, highly similar to Elongation factor 1-gamma
GST Gel7	IPI00008483	59644	97	12 (1)	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
GST Gel7	IPI00909534	24089	91	5 (2)	-cDNA FLJ59433, highly similar to Elongation factor 1-gamma
GST Gel7	IPI00005724	45254	78	7 (2)	LANCL1 LanC-like protein 1
GST Gel7	IPI00019359	62027	56	2 (1)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
GST Gel7	IPI00646304	23728	48	11 (1)	PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
GST Gel7	IPI00167879		37	9 (1)	FLJ36000 Conserved hypothetical protein

Tabelle 27: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie in der kombinierten Suche mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine aus den Pulldown-Experimenten mit dem Fusionsprotein GST-TRPV5-N7 aus Ansätzen mit Plazentahomogenat. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant waren. Der Score ist ab einem Wert von 36 (bzw. Gel 6 35) signifikant.

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel2	IPI00005724	45254	969	56	LANCL1 LanC-like protein 1
N7 Gel2	IPI00644712	69799	582	45	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
N7 Gel2	IPI00024915	22012	365	13	PRDX5 Isoform Mitochondrial of Peroxiredoxin-5, mitochondrial
N7 Gel2	IPI00003865	70854	346	19	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
N7 Gel2	IPI00007702	69978	321	11 (0)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2
N7 Gel2	IPI00007289	59482	296	7	ALPP Alkaline phosphatase, placental type precursor
N7 Gel2	IPI00021439	41710	248	12	ACTB Actin, cytoplasmic 1
N7 Gel2	IPI00013296	17708	228	17	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
N7 Gel2	IPI00012119	39722	226	8	DCN Isoform A of Decorin
N7 Gel2	IPI00221226	75826	209	31	ANXA6 Annexin A6
N7 Gel2	IPI00418169	40386	179	10	ANXA2 annexin A2 isoform 1
N7 Gel2	IPI00410714	15248	178	12	HBA1;HBA2 Hemoglobin subunit alpha
N7 Gel2	IPI00554676	16116	160	8	HBG2 Hemoglobin subunit gamma-2
N7 Gel2	IPI00941328	25213	155	5 (1)	HSPA1B;HSPA1A 25 kDa protein
N7 Gel2	IPI00219155	15788	131	11	RPL27 60S ribosomal protein L27
N7 Gel2	IPI00456758	16551	111	6	RPL27A 60S ribosomal protein L27a
N7 Gel2	IPI00012750	13734	111	7	RPS25 40S ribosomal protein S25
N7 Gel2	IPI00218918	38690	106	14 (2)	ANXA1 Annexin A1
N7 Gel2	IPI00908582	135060	98	8 (2)	FLII cDNA FLJ50164, highly similar to Protein flightless-1 homolog
N7 Gel2	IPI00220706	16130	93	7 (0)	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel2	IPI00302133	82497	85	11 (2)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
N7 Gel2	IPI00335168	16919	81	6 (1)	MYL6;MYL6B Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6
N7 Gel2	IPI00395998	15850	80	5 (2)	RPL32;SNORA7A 60S ribosomal protein L32
N7 Gel2	IPI00654755	15988	77	5 (1)	HBB Hemoglobin subunit beta
N7 Gel2	IPI00473014	18493	76	4 (1)	DSTN Destrin
N7 Gel2	IPI00072377	33469	69	3 (1)	SET Isoform 1 of Protein SET
N7 Gel2	IPI00221089	17212	62	10 (2)	RPS13 40S ribosomal protein S13
N7 Gel2	IPI00419585	18001	61	7 (1)	PPIA Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
N7 Gel2	IPI00412607	14543	60	4 (1)	RPL35 60S ribosomal protein L35
N7 Gel2	IPI00554648	53671	56	3 (1)	KRT8 Keratin, type II cytoskeletal 8
N7 Gel2	IPI00216298	11730	51	3 (1)	TXN Thioredoxin
N7 Gel2	IPI00328309	67809	47	1	DCP1B mRNA-decapping enzyme 1B
N7 Gel2	IPI00218606	15798	43	1	RPS23 40S ribosomal protein S23
N7 Gel2	IPI00939498	-	41	8 (1)	- 29 kDa protein
N7 Gel2	IPI00215888	74560	40	5 (1)	SRP72 Signal recognition particle 72 kDa protein
N7 Gel2	IPI00921878	-	39	5 (1)	ABO ABO glycosyltransferase (Fragment)
N7 Gel2	IPI00413272	156092	39	2 (1)	MED23 Isoform 3 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
N7 Gel2	IPI00647563	22664	39	2 (1)	IRAK1 Protein
N7 Gel2	IPI00029750	15413	39	5 (1)	RPS24 Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24
N7 Gel2	IPI00002547	74529	38	25 (0)	CAPN6 Calpain-6
N7 Gel4	IPI00455315	38580	735	37	ANXA2 Annexin A2
N7 Gel4	IPI00005724	45254	637	32	LANCL1 LanC-like protein 1
N7 Gel4	IPI00843838	42225	457	17	HSD3B1 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta 5->4-isomerase type 1
N7 Gel4	IPI00032139	42376	405	27	SERPINB9 Serpin B9
N7 Gel4	IPI00644712	69799	245	23	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
N7 Gel4	IPI00300050	44098	236	18	HSD11B2 Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2
N7 Gel4	IPI00302133	82497	140	25	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
N7 Gel4	IPI00030363	45171	105	12	ACAT1 Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
N7 Gel4	IPI00007702	69978	67	7 (1)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2
N7 Gel4	IPI00339269	70984	66	5 (0)	HSPA6 Heat shock 70 kDa protein 6
N7 Gel4	IPI00006995	42094	65	6 (1)	P11 Placental protein 11

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel4	IPI00000874	22096	64	7 (1)	PRDX1 Peroxiredoxin-1
N7 Gel4	IPI00019359	62027	53	6 (1)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
N7 Gel4	IPI00002547	74529	44	14 (1)	CAPN6 Calpain-6
N7 Gel4	IPI00167879		38	5 (1)	FLJ36000 Conserved hypothetical protein
N7 Gel4	IPI00164352		37	3 (1)	ZNF292 zinc finger protein 292
N7 Gel4	IPI00939498		36	6 (1)	-29 kDa protein
N7 Gel6	IPI00021439	41710	1799	83	ACTB Actin, cytoplasmic 1
N7 Gel6	IPI00021428	42024	939	58 (1)	ACTA1 Actin, alpha skeletal muscle
N7 Gel6	IPI00479743	121286	887	37 (1)	POTEE Isoform 1 of POTE ankyrin domain family member E
N7 Gel6	IPI00005724	45254	692	46	LANCL1 LanC-like protein 1
N7 Gel6	IPI00022434	71658	546	48	ALB Putative uncharacterized protein ALB
N7 Gel6	IPI00745872	69321	456	47	ALB Isoform 1 of Serum albumin
N7 Gel6	IPI00644712	69799	530	35	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
N7 Gel6	IPI00008483	59644	476	39	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
N7 Gel6	IPI00027230	92411	335	28	HSP90B1 Endoplasmic
N7 Gel6	IPI00246994	42427	238	12	HSD3B1 Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isom
N7 Gel6	IPI00302133	82497	222	28	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
N7 Gel6	IPI00220327	65999	182	17	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
N7 Gel6	IPI00021304	65825	110	12 (0)	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
N7 Gel6	IPI00549413	22741	107	3 (1)	ANXA1 Annexin A1
N7 Gel6	IPI00007702	69978	84	7 (1)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2
N7 Gel6	IPI00748145	40425	76	4 (1)	GNAI2 Isoform 1 of Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit
N7 Gel6	IPI00293665	60030	73	7 (0)	KRT6B Keratin, type II cytoskeletal 6B
N7 Gel6	IPI00009865	58818	72	10 (2)	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
N7 Gel6	IPI00300050	44098	71	5 (1)	HSD11B2 Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2
N7 Gel6	IPI00414676	83212	70	4 (0)	HSP90AB1 Heat shock protein HSP 90-beta
N7 Gel6	IPI00013808	104788	61	15 (1)	ACTN4 Alpha-actinin-4
N7 Gel6	IPI00384938	52819	58	2 (2)	IGHV4-31;LOC100294459;LOC100290320;IGHG1 Putative uncharacterized protein D
N7 Gel6	IPI00013508	108993	58	8 (0)	ACTN1 Alpha-actinin-1
N7 Gel6	IPI00423462	56388	52	5 (1)	IGHA1 Putative uncharacterized protein DKFZp686K18196 (Fragment)
N7 Gel6	IPI00909570	62810	51	10 (1)	EEF2 cDNA FLJ56548, highly similar to Elongation factor 2

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel6	IPI00186290	95277	50	14 (0)	EEF2 Elongation factor 2
N7 Gel6	IPI00411639	32975	49	1 (1)	RPSA;RPSAP15 Laminin receptor-like protein LAMRL5
N7 Gel6	IPI00297550	83215	47	11(1)	F13A1 Coagulation factor XIII A chain
N7 Gel6	IPI00220834	82652	46	3 (1)	XRCC5 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
N7 Gel6	IPI00738914		45	1 (0)	MTL5 Isoform 2 of Tesmin
N7 Gel6	IPI00064158	142650	43	11 (1)	TTBK1 Isoform 1 of Tau-tubulin kinase 1
N7 Gel6	IPI00647428	13865	42	1 (1)	E2F3 E2F3 protein
N7 Gel6	IPI00939826	59118	42	4 (0)	IGHM 57 kDa protein
N7 Gel6	IPI00026958		42	1 (2)	FDXR Isoform Short of NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial
N7 Gel6	IPI00241841	57774	42	6 (0)	KRT79 Keratin, type II cytoskeletal 79
N7 Gel6	IPI00413272	156092	40	10 (1)	MED23 Isoform 3 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
N7 Gel6	IPI00943960	35327	40	1 (1)	RCE1 RCE1 protein (Fragment)
N7 Gel6	IPI00019359	62027	39	5 (1)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
N7 Gel6	IPI00020984	71458	38	4 (1)	CANX cDNA FLJ55574, highly similar to Calnexin
N7 Gel6	IPI00418169	40386	38	3 (1)	ANXA2 annexin A2 isoform 1
N7 Gel6	IPI00783987	187030	36	8 (0)	C3 Complement C3 (Fragment)
N7 Gel6	IPI00016095	45749	36	1 (1)	MTERF Transcription termination factor, mitochondrial
N7 Gel6	IPI00010779	28504	35	2 (0)	TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain
N7 Gel7	IPI00021439	41710	901	39	ACTB Actin, cytoplasmic 1
N7 Gel7	IPI00008483	59644	692	37	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
N7 Gel7	IPI00007289	59482	537	8	ALPP Alkaline phosphatase, placental type precursor
N7 Gel7	IPI00479743	121286	490	20 (1)	POTEE Isoform 1 of POTE ankyrin domain family member E
N7 Gel7	IPI00021428	42024	445	28 (1)	ACTA1 Actin, alpha skeletal muscle
N7 Gel7	IPI00887316	103670	402	21 (0)	LOC727848;LOC653269;POTEK actin, beta-like 3
N7 Gel7	IPI00644712	69799	288	20	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
N7 Gel7	IPI00005724	45254	271	15	LANCL1 LanC-like protein 1
N7 Gel7	IPI00221226	75826	261	10	ANXA6 Annexin A6
N7 Gel7	IPI00002547	74529	214	24	CAPN6 Calpain-6
N7 Gel7	IPI00002459	75229	203	10 (1)	ANXA6 annexin VI isoform 2
N7 Gel7	IPI00022463	77000	182	16	TF Serotransferrin
N7 Gel7	IPI00376798	20240	101	3 (2)	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel7	IPI00247583	18553	87	5 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
N7 Gel7	IPI00026202	20749	71	6 (1)	RPL18A 60S ribosomal protein L18a
N7 Gel7	IPI00218918	38690	65	1 (1)	ANXA1 Annexin A1
N7 Gel7	IPI00221088	22578	62	12 (1)	RPS9 40S ribosomal protein S9
N7 Gel7	IPI00003865	70854	62	7 (1)	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
N7 Gel7	IPI00022434	71658	61	12 (1)	ALB Putative uncharacterized protein ALB
N7 Gel7	IPI00021266	17684	58	4 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
N7 Gel7	IPI00009865	58818	58	7 (1)	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
N7 Gel7	IPI00010204	19318	49	5 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
N7 Gel7	IPI00293665	60030	46	5 (1)	KRT6B Keratin, type II cytoskeletal 6B
N7 Gel7	IPI00413324	21383	45	7 (1)	RPL17 60S ribosomal protein L17
N7 Gel7	IPI00300371	135492	44	3 (1)	SF3B3 Isoform 1 of Splicing factor 3B subunit 3
N7 Gel7	IPI00220706	16130	44	3 (1)	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1
N7 Gel7	IPI00410714	15248	41	2 (1)	HBA1;HBA2 Hemoglobin subunit alpha
N7 Gel7	IPI00020416	138263	41	8 (1)	TPP2 Tripeptidyl-peptidase 2
N7 Gel7	IPI00186290	95277	39	5 (1)	EEF2 Elongation factor 2
N7 Gel7	IPI00291510	55770	39	1 (1)	IMPDH2 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
N7 Gel7	IPI00943960	35327	39	3 (3)	RCE1 RCE1 protein (Fragment)
N7 Gel7	IPI00646304	23728	38	12 (1)	PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
N7 Gel7	IPI00339269	70984	38	5	HSPA6 Heat shock 70 kDa protein 6
N7 Gel7	IPI00003362	72377	38	4 (0)	HSPA5 HSPA5 protein
N7 Gel7	IPI00069693	23386	37	2 (1)	- Putative uncharacterized protein RPL14P1

Tabelle 28: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie in der kombinierten Suche mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine aus den Pulldown-Experimenten mit dem Fusionsprotein GST-TRPV5-C4 aus Ansätzen mit Plazentahomogenat. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant waren. Der Score ist ab einem Wert von 36 (bzw. Gel 6 35) signifikant.

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score:	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel2	IPI00644712	69799	2477	112	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
C4 Gel2	IPI00418169	40386	1395	46	ANXA2 annexin A2 isoform 1

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score:	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel2	IPI00003362	72377	533	30	HSPA5 HSPA5 protein
C4 Gel2	IPI00000494	34341	319	22	RPL5 60S ribosomal protein L5
C4 Gel2	IPI00218918	38690	290	9	ANXA1 Annexin A1
C4 Gel2	IPI00008483	59644	221	11	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
C4 Gel2	IPI00216135	32856	192	24	TPM1 Isoform 3 of Tropomyosin alpha-1 chain
C4 Gel2	IPI00418471	53619	191	19	VIM Vimentin
C4 Gel2	IPI00604537	32717	189	26 (0)	TPM1 tropomyosin 1 alpha chain isoform 3
C4 Gel2	IPI00003865	70854	176	16 (1)	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
C4 Gel2	IPI00002547	74529	168	20	CAPN6 Calpain-6
C4 Gel2	IPI00329389	32708	128	10	RPL6 60S ribosomal protein L6
C4 Gel2	IPI00220327	65999	122	18	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
C4 Gel2	IPI00302133	82497	119	11 (1)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
C4 Gel2	IPI00298971	54271	104	8 (1)	VTN Vitronectin
C4 Gel2	IPI00339269	70984	86	11 (0)	HSPA6 Heat shock 70 kDa protein 6
C4 Gel2	IPI00002459	75229	83	8 (1)	ANXA6 annexin VI isoform 2
C4 Gel2	IPI00021304	65825	81	11 (1)	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
C4 Gel2	IPI00414008	70310	77	4 (1)	LMOD1 Putative uncharacterized protein LMOD1
C4 Gel2	IPI00220834	82652	75	3 (1)	XRCC5 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
C4 Gel2	IPI00465084	53503	63	4 (0)	DES Desmin
C4 Gel2	IPI00100980	61123	53	5 (1)	EHD2 EH domain-containing protein 2
C4 Gel2	IPI00005613	27854	51	2 (1)	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
C4 Gel2	IPI00411639	32975	51	1 (1)	RPSA;RPSAP15 Laminin receptor-like protein LAMRL5
C4 Gel2	IPI00007244	83815	50	3 (1)	MPO Isoform H17 of Myeloperoxidase
C4 Gel2	IPI00384697	47330	48	4 (1)	ALB Isoform 2 of Serum albumin
C4 Gel2	IPI00009865	58818	48	7 (1)	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
C4 Gel2	IPI00789750	26547	48	3 (0)	KRT14 27 kDa protein
C4 Gel2	IPI00790172	50323	48	2 (0)	KRT35 Keratin, type I cuticular Ha5
C4 Gel2	IPI00069750	59838	46	4 (0)	PUF60 Isoform 1 of Poly(U)-binding-splicing factor PUF60
C4 Gel2	IPI00739770		44	3 (1)	C2orf77 hypothetical protein LOC129881
C4 Gel2	IPI00020501	227199	38	11 (1)	MYH11 Myosin-11
C4 Gel2	IPI00607818	228526	38	7 (0)	MYH14 myosin, heavy chain 14 isoform 1
C4 Gel2	IPI00009802		37	2 (1)	VCAN Isoform V0 of Versican core protein

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score:	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel2	IPI00291939	143144	37	6 (0)	SMC1A Structural maintenance of chromosomes protein 1A
C4 Gel4	IPI00644712	69799	1792	94	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
C4 Gel4	IPI00418169	40386	1046	40	ANXA2 annexin A2 isoform 1
C4 Gel4	IPI00007289	59482	403	14	ALPP Alkaline phosphatase, placental type precursor
C4 Gel4	IPI00002459	75229	305	24	ANXA6 annexin VI isoform 2
C4 Gel4	IPI00550021	46080	286	14	RPL3 60S ribosomal protein L3
C4 Gel4	IPI00008483	59644	283	26	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
C4 Gel4	IPI00218918	38690	278	17	ANXA1 Annexin A1
C4 Gel4	IPI00005724	45254	230	22	LANCL1 LanC-like protein 1
C4 Gel4	IPI00302133	82497	215	21 (1)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
C4 Gel4	IPI00654755	15988	194	10	HBB Hemoglobin subunit beta
C4 Gel4	IPI00216691	15045	191	7	PFN1 Profilin-1
C4 Gel4	IPI00220706	16130	167	10 (1)	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1
C4 Gel4	IPI00215719	21621	161	5	RPL18 60S ribosomal protein L18
C4 Gel4	IPI00549343	11302	103	3	VAMP3 Vesicle-associated membrane protein 3
C4 Gel4	IPI00019359	62027	98	8 (1)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
C4 Gel4	IPI00176193	193394	86	21 (2)	COL14A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIV) chain
C4 Gel4	IPI00075248	16827	82	5 (2)	CALM2;CALM1;CALM3;C2orf61 Calmodulin
C4 Gel4	IPI00220741	279826	78	9 (1)	SPTA1 Isoform 1 of Spectrin alpha chain, erythrocyte
C4 Gel4	IPI00236556	87193	72	9	MPO Isoform H7 of Myeloperoxidase
C4 Gel4	IPI00220194	54049	72	3 (1)	SLC2A1 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
C4 Gel4	IPI00456758	16551	72	2 (1)	RPL27A 60S ribosomal protein L27a
C4 Gel4	IPI00480022	15814	67	3 (1)	GOLGA7 Golgin subfamily A member 7
C4 Gel4	IPI00219852	44209	63	1 (1)	CD46 Isoform B of Membrane cofactor protein
C4 Gel4	IPI00385034	37391	57	3 (1)	SLC9A3R2 Isoform 1 of Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2
C4 Gel4	IPI00791534	103811	57	8	-104 kDa protein
C4 Gel4	IPI00030911	11431	57	5 (2)	VAMP8 Vesicle-associated membrane protein 8
C4 Gel4	IPI00022434	71658	56	5 (1)	ALB Putative uncharacterized protein ALB
C4 Gel4	IPI00410714	15248	55	5 (1)	HBA1;HBA2 Hemoglobin subunit alpha
C4 Gel4	IPI00025447	47839	54	3 (1)	EEF1A1 Elongation factor 1-alpha
C4 Gel4	IPI00007702	69978	49	5 (1)	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score:	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel4	IPI00903096	15744	46	2 (1)	-Putative uncharacterized protein ENSP00000385251 (Fragment)
C4 Gel4	IPI00013296	17708	45	7 (0)	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
C4 Gel4	IPI00910357		44	1 (1)	-cDNA FLJ57296
C4 Gel4	IPI00219219	14706	41	2 (1)	LGALS1 Galectin-1
C4 Gel4	IPI00385264	43030	40	1 (1)	-Ig mu heavy chain disease protein
C4 Gel4	IPI00103980	31758	38	3 (1)	CTTNBP2NL CTTNBP2 N-terminal like
C4 Gel4	IPI00008433	22862	38	3 (1)	RPS5 40S ribosomal protein S5
C4 Gel4	IPI00413272	156092	37	2 (1)	MED23 Isoform 3 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
C4 Gel4	IPI00219155	15788	37	1 (1)	RPL27 60S ribosomal protein L27
C4 Gel4	IPI00939498	29329	36	7 (1)	-29 kDa protein
C4 Gel4	IPI00178415	105315	36	3 (1)	PGAP1 Isoform 1 of GPI inositol-deacylase
C4 Gel4	IPI00759637	3713879	36	40 (1)	TTN Isoform 4 of Titin
C4 Gel6	IPI00302133	82497	560	3	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
C4 Gel6	IPI00644712	69799	517	33	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
C4 Gel6	IPI00005724	45854	449	32	LANCL1 LanC-like protein 1
C4 Gel6	IPI00418169	40386	343	20	ANXA2 annexin A2 isoform 1
C4 Gel6	IPI00022434	71658	336	42	ALB Putative uncharacterized protein ALB
C4 Gel6	IPI00220327	65999	301	31	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
C4 Gel6	IPI00220834	82652	227	20	XRCC5 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
C4 Gel6	IPI00021304	65825	220	25	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
C4 Gel6	IPI00008483	59644	168	20	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
C4 Gel6	IPI00215719	21621	168	8	RPL18 60S ribosomal protein L18
C4 Gel6	IPI00003865	70854	146	7 (2)	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
C4 Gel6	IPI00003362	72377	131	14 (2)	HSPA5 HSPA5 protein
C4 Gel6	IPI00217966	39812	125	2 (2)	LDHA L-lactate dehydrogenase
C4 Gel6	IPI00002547	74529	125	21	CAPN6 Calpain-6
C4 Gel6	IPI00247583	18553	75	5 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
C4 Gel6	IPI00218918	38690	67	3 (1)	ANXA1 Annexin A1
C4 Gel6	IPI00002459	75229	61	7 (1)	ANXA6 annexin VI isoform 2
C4 Gel6	IPI00010204	19318	49	5 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
C4 Gel6	IPI00166612	448935	45	2 (2)	CMYA5 Cardiomyopathy-associated protein 5

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score:	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel6	IPI00019359	62027	40	6 (0)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
C4 Gel6	IPI00000874	22096	38	1 (1)	PRDX1 Peroxiredoxin-1
C4 Gel7	IPI00008483	59644	470	36	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
C4 Gel7	IPI00290380	57341	423	6 (1)	ALPPL2 Alkaline phosphatase, placental-like
C4 Gel7	IPI00418169	40386	295	22	ANXA2 annexin A2 isoform 1
C4 Gel7	IPI00220834	82652	254	18	XRCC5 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
C4 Gel7	IPI00002459	75229	225	4 (2)	ANXA6 annexin VI isoform 2
C4 Gel7	IPI00302133	82497	195	13 (1)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
C4 Gel7	IPI00215719	21621	190	4	RPL18 60S ribosomal protein L18
C4 Gel7	IPI00216704	267661	163	13	SPTB Isoform 2 of Spectrin beta chain, erythrocyte
C4 Gel7	IPI00554498	36288	119	4 (2)	LDHC L-lactate dehydrogenase C chain
C4 Gel7	IPI00217966	39812	114	5 (0)	LDHA L-lactate dehydrogenase
C4 Gel7	IPI00376798	20240	110	8 (2)	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11
C4 Gel7	IPI00027230	92411	92	15 (1)	HSP90B1 Endoplasmic
C4 Gel7	IPI00022463	77000	86	17 (2)	TF Serotransferrin
C4 Gel7	IPI00220194	54049	82	2 (1)	SLC2A1 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
C4 Gel7	IPI00000494	34341	77	9 (2)	RPL5 60S ribosomal protein L5
C4 Gel7	IPI00021266	17684	77	2 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
C4 Gel7	IPI00247583	18553	76	4 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
C4 Gel7	IPI00015148	20812	70	6 (2)	RAP1B Ras-related protein Rap-1b
C4 Gel7	IPI00021304	65825	69	5 (1)	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
C4 Gel7	IPI00008433	22862	55	2 (1)	RPS5 40S ribosomal protein S5
C4 Gel7	IPI00748330	208110	53	5 (1)	ANK1 Isoform Br21 of Ankyrin-1
C4 Gel7	IPI00843975	69370	52	9 (1)	EZR Ezrin
C4 Gel7	IPI00646304	23728	51	4 (1)	PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
C4 Gel7	IPI00010204	19318	51	8 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
C4 Gel7	IPI00550021	46080	50	8	RPL3 60S ribosomal protein L3
C4 Gel7	IPI00011302	14168	48	3 (1)	CD59 CD59 glycoprotein
C4 Gel7	IPI00643152	77513	38	4 (0)	HSPA1L cDNA FLJ56386, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1L
C4 Gel7	IPI00003362	72377	38	6 (0)	HSPA5 HSPA5 protein
C4 Gel7	IPI00014424	50438	37	1 (1)	EEF1A2 Elongation factor 1-alpha 2

Tabelle 29: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie in der kombinierten Suche mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine aus den Pulldown-Experimenten mit dem Protein GST aus Ansätzen mit Plazentamikrosomen. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant waren. Der Score ist ab einem Wert von 36 signifikant.

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
GST Gel 1	IPI00418169	40386	480	45	ANXA2 annexin A2 isoform 1
GST Gel 1	IPI00937735	72881	229	8	ACADVL cDNA FLJ55801, highly similar to Very-long-chain specific acyl-CoAde
GST Gel 1	IPI00220194	54049	115	3 (1)	SLC2A1 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
GST Gel 1	IPI00302133	82497	106	28 (2)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
GST Gel 1	IPI00220327	65999	77	17 (2)	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
GST Gel 1	IPI00219757	23341	71	8 (1)	GSTP1 Glutathione S-transferase P
GST Gel 1	IPI00218918	38690	63	4 (1)	ANXA1 Annexin A1
GST Gel 1	IPI00007289	59482	47	2 (1)	ALPP Alkaline phosphatase, placental type precursor
GST Gel 1	IPI00007461	77267	46	1 (1)	DPY19L1 Isoform 1 of Protein dpy-19 homolog 1
GST Gel 1	IPI00410097	38633	41	4 (1)	DHDDS Isoform 1 of Dehydrololichyl diphosphate synthase
GST Gel 1	IPI00298828	38273	40	2 (1)	APOH Beta-2-glycoprotein 1
GST Gel 1	IPI00009865	58818	39	11 (1)	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
GST Gel 1	IPI00939498		38	19 (1)	29 kDa protein
GST Gel5	IPI00477090	51805	411	18	Protein (IGHM Protein)
GST Gel5	IPI00005724	45254	253	19	LANCL1 LanC-like protein 1
GST Gel5	IPI00302133	82497	234	22 (2)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
GST Gel5	IPI00219757	23341	140	40 (1)	GSTP1 Glutathione S-transferase P
GST Gel5	IPI00220327	65999	132	42	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
GST Gel5	IPI00399007	46032	115	16	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)
GST Gel5	IPI00418169	40386	93	15 (1)	ANXA2 annexin A2 isoform 1
GST Gel5	IPI00816314	38580	70	8 (1)	IGHV4-31;LOC100294459;LOC100290320;IGHG1 Putative uncharacterized protein D
GST Gel5	IPI00217966	39812	55	6 (1)	LDHA L-lactate dehydrogenase
GST Gel5	IPI00009865	58818	51	24 (1)	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
GST Gel5	IPI00555872	12835	50	3 (1)	IGHV3-48 Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragme

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
GST Gel5	IPI00418931	15465	47	47 (1)	FLJ45139 cDNA FLJ45139 fis, clone BRAWH3039623
GST Gel5	IPI00019463	62056	42	1(1)	EIF2AK2 Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase
GST Gel5	IPI00878282	22844	38	1(1)	ALB 23 kDa protein
GST Gel5	IPI00921878		37	11 (1)	ABO ABO glycosyltransferase (Fragment)
GST Gel5	IPI00218918	38690	36	2 (1)	ANXA1 Annexin A1
GST Gel8	IPI00219757	23341	520	18	GSTP1 Glutathione S-transferase P
GST Gel8	IPI00453473	11360	250	14	HIST1H4I;HIST1H4C;HIST1H4F;HIST1H4D;HIST1H4B; HIST1H4H;HIST2H4B;HIST1H4E;HIS
GST Gel8	IPI00298497	55892	166	19 (4)	FGB Fibrinogen beta chain
GST Gel8	IPI00021439	41710	156	10	ACTB Actin, cytoplasmic 1
GST Gel8	IPI00302133	82497	144	8 (1)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
GST Gel8	IPI00021891	51479	91	19 (2)	FGG Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain (auch Gamma-A)
GST Gel8	IPI00554788	48029	90	22 (2)	KRT18 Keratin, type I cytoskeletal 18
GST Gel8	IPI00291136	108462	80	6 (1)	COL6A1 Collagen alpha-1(VI) chain
GST Gel8	IPI00794644	20831	79	15 (2)	KRT19 21 kDa protein
GST Gel8	IPI00479145				KRT19 Keratin, type I cytoskeletal 19
GST Gel8	IPI00003935	13912	59	3 (1)	HIST2H2BE Histone H2B type 2-E
GST Gel8	IPI00418169	40386	54	8 (1)	ANXA2 annexin A2 isoform 1
GST Gel8	IPI00787323	49418	47	10 (1)	hCG_1988300 Similar to Keratin, type II cytoskeletal 8
GST Gel8	IPI00017870	55117	47	4 (1)	- Keratin-8-like protein 1
GST Gel8	IPI00019359	62027	46	1	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
GST Gel8	IPI00300371	135492	43	5 (0)	SF3B3 Isoform 1 of Splicing factor 3B subunit 3
GST Gel8	IPI00554648	53671	40	17 (1)	KRT8 Keratin, type II cytoskeletal 8

Tabelle 30: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie in der kombinierten Suche mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine aus den Pulldown-Experimenten mit dem Fusionsprotein GST-TRPV5-N7 aus Ansätzen mit Plazentamikrosomen. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant waren. Der Score ist ab einem Wert von 36 signifikant.

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel1	IPI00455315	38580	2280	117	ANXA2 Annexin A2
N7 Gel1	IPI00021266	17684	214	12	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
N7 Gel1	IPI00010204	19318	135	13 (1)	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
N7 Gel1	IPI00376798	20240	123	10	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11
N7 Gel1	IPI00215719	21621	110	1 (1)	RPL18 60S ribosomal protein L18
N7 Gel1	IPI00302133	82497	81	18 (3)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
N7 Gel1	IPI00247583	18553	68	3 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
N7 Gel1	IPI00025091	18419	59	5 (1)	RPS11 40S ribosomal protein S11
N7 Gel1	IPI00646304	23728	55	3 (1)	PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
N7 Gel1	IPI00064350		52	5 (3)	C12orf52 Isoform 1 of Uncharacterized protein C12orf52
N7 Gel1	IPI00008483	59644	47	2 (1)	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A (bzw. B)
N7 Gel1	IPI00009797		47	2 (1)	TM7SF3 Transmembrane 7 superfamily member 3
N7 Gel1	IPI00218918	38690	46	6 (0)	ANXA1 Annexin A1
N7 Gel1	IPI00161276		44	1	WFDC3 WAP four-disulfide core domain protein 3
N7 Gel1	IPI00413272	156092	42	2 (2)	MED23 Isoform 3 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
N7 Gel1	IPI00007289	59482	41	1	ALPP Alkaline phosphatase, placental type precursor
N7 Gel1	IPI00647563	22664	39	2 (2)	IRAK1 Protein
N7 Gel1	IPI00003081		38	2 (1)	PTGER1 Prostaglandin E2 receptor EP1 subtype
N7 Gel1	IPI00027270	17248	38	9 (0)	RPL26 60S ribosomal protein L26
N7 Gel5	IPI00925667	43159	1306	130	TRPV5 TRPV5 protein
N7 Gel5	IPI00302133	82497	1306	132	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
N7 Gel5	IPI00418169	40386	750	44	ANXA2 annexin A2 isoform 1
N7 Gel5	IPI00005724	45224	261	12	LANCL1 LanC-like protein 1
N7 Gel5	IPI00218918	38690	198	12	ANXA1 Annexin A1
N7 Gel5	IPI00003918	47667	140	16	RPL4 60S ribosomal protein L4
N7 Gel5	IPI00246994	42427	99	3	HSD3B1 Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isom
N7 Gel5	IPI00411639	32975	76	5 (1)	RPSA;RPSAP15 Laminin receptor-like protein LAMRL5
N7 Gel5	IPI00550021	46080	58	2 (1)	RPL3 60S ribosomal protein L3

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel5	IPI00008603	41982	53	4 (1)	ACTA2 Actin, aortic smooth muscle
N7 Gel5	IPI00010779	28504	53	3 (1)	TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain
N7 Gel5	IPI00935718	5660	51	8 (3)	LOC100293239;LOC100290044;LOC100289018 hypothetical protein XP_002342868
N7 Gel5	IPI00012074	70899	50	2 (1)	HNRNPR Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
N7 Gel5	IPI00939498		42	8 (3)	29 kDa protein
N7 Gel5	IPI00296211	75887	37	2 (1)	DYM Isoform 1 of Dymeclin
N7 Gel5	IPI00028213	89594	36	7 (0)	SEMA3D Semaphorin-3D
N7 Gel8	IPI00219757	23341	1152	30	GSTP1 Glutathione S-transferase P
N7 Gel8	IPI00455315	38580	673	27	ANXA2 Annexin A2
N7 Gel8	IPI00334627	38635	549	21 (0)	ANXA2P2 Putative annexin A2-like protein
N7 Gel8	IPI00453473	11360	381	17	HIST1H4I;HIST1H4C;HIST1H4F;HIST1H4D;HIST1H4B;HIST1H4H; HIST2H4B;HIST1H4E;HIS
N7 Gel8	IPI00020101	13898	270	23	HIST1H2BE;HIST1H2BF;HIST1H2BG;HIST1H2BI;HIST1H2BC histone cluster 1, H2bg
N7 Gel8	IPI00013296	17708	264	16	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
N7 Gel8	IPI00302133	82497	244	32	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
N7 Gel8	IPI00291136	108462	213	16	COL6A1 Collagen alpha-1(VI) chain
N7 Gel8	IPI00221088	22578	208	41	RPS9 40S ribosomal protein S9
N7 Gel8	IPI00903251	13606	196	15	- 14 kDa protein
N7 Gel8	IPI00217467	21852	194	20 (2)	HIST1H1E Histone H1.4
N7 Gel8	IPI00026271	16263	181	4 (4)	RPS14 40S ribosomal protein S14
N7 Gel8	IPI00413324	21989	170	15	RPL17 60S ribosomal protein L17
N7 Gel8	IPI00173589	17209	165	8 (1)	- 17 kDa protein
N7 Gel8	IPI00215719	21621	150	5 (2)	RPL18 60S ribosomal protein L18
N7 Gel8	IPI00412607	14543	150	3 (2)	RPL35 60S ribosomal protein L35
N7 Gel8	IPI00024915	22012	147	6	PRDX5 Isoform Mitochondrial of Peroxiredoxin-5, mitochondrial
N7 Gel8	IPI00219153	14778	141	3 (2)	RPL22 60S ribosomal protein L22
N7 Gel8	IPI00021266	17684	132	3 (1)	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
N7 Gel8	IPI00247583	18553	129	10 (2)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
N7 Gel8	IPI00219155	15788	125	5	RPL27 60S ribosomal protein L27
N7 Gel8	IPI00000874	22096	114	9	PRDX1 Peroxiredoxin-1
N7 Gel8	IPI00304840	108512	104	12	COL6A2 Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel8	IPI00021885	94914	101	7 (1)	FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain
N7 Gel8	IPI00554788	48029	100	18	KRT18 Keratin, type I cytoskeletal 18
N7 Gel8	IPI00021891	51479	99	15	FGG Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain
N7 Gel8	IPI00025329	23451	95	4 (1)	RPL19 60S ribosomal protein L19
N7 Gel8	IPI00221089	17212	93	21 (1)	RPS13 40S ribosomal protein S13
N7 Gel8	IPI00554648	53671	90	15	KRT8 Keratin, type II cytoskeletal 8
N7 Gel8	IPI00021840	28663	89	6 (1)	RPS6 40S ribosomal protein S6
N7 Gel8	IPI00010204	19318	80	13	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
N7 Gel8	IPI00218918	38690	78	5 (1)	ANXA1 Annexin A1
N7 Gel8	IPI00013415	22113	72	6 (2)	RPS7 40S ribosomal protein S7
N7 Gel8	IPI00219037	15135	70	6 (2)	H2AFX Histone H2A.x
N7 Gel8	IPI00027255	22750	70	2 (1)	MYL6B Myosin light chain 6B
N7 Gel8	IPI00456758	16551	69	4 (1)	RPL27A 60S ribosomal protein L27a
N7 Gel8	IPI00019502	226392	68	18	MYH9 Isoform 1 of Myosin-9
N7 Gel8	IPI00171611	15379	65	18 (2)	HIST2H3A;HIST2H3C;HIST2H3D Histone H3.2
N7 Gel8	IPI00455457	15421	64	18 (1)	Histone H3
N7 Gel8	IPI00221222	14386	63	2 (1)	SUB1 Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15
N7 Gel8	IPI00479145	44065	61	11 (0)	KRT19 Keratin, type I cytoskeletal 19
N7 Gel8	IPI00397526	228858	61	8 (0)	MYH10 Isoform 1 of Myosin-10
N7 Gel8	IPI00219156	12776	58	1	RPL30 60S ribosomal protein L30
N7 Gel8	IPI00922375	82884	56	5 (1)	LOC100292090 hypothetical protein XP_002345529
N7 Gel8	IPI00221092	16435	56	1	RPS16 40S ribosomal protein S16
N7 Gel8	IPI00739539	121367	53	3 (1)	POTEF POTE ankyrin domain family member F
N7 Gel8	IPI00007611	23263	51	3 (1)	ATP5O ATP synthase subunit O, mitochondrial
N7 Gel8	IPI00029750	15413	50	2 (1)	RPS24 Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24
N7 Gel8	IPI00008433	22862	47	7 (47)	RPS5 40S ribosomal protein S5
N7 Gel8	IPI00171443	36993	45	4 (0)	ALG2 Isoform 2 of Alpha-1,3-mannosyltransferase ALG2
N7 Gel8	IPI00910357		44	1	cDNA FLJ57296
N7 Gel8	IPI00418983	163829	42	10 (0)	CCDC18 sarcoma antigen NY-SAR-41
N7 Gel8	IPI00176193	193394	41	10 (0)	COL14A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIV) chain
N7 Gel8	IPI00418931	15465	41	6 (2)	FLJ45139 cDNA FLJ45139 fis, clone BRAWH3039623
N7 Gel8	IPI00297181	87005	41	2 (1)	CDH7 Cadherin-7

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
N7 Gel8	IPI00796114	189594	40	3 (1)	C6orf103 hypothetical protein LOC79747
N7 Gel8	IPI00255836	151892	39	5 (0)	FER1L4 Isoform 3 of Fer-1-like protein 4
N7 Gel8	IPI00935718	5560	39	1	LOC100293239;LOC100290044;LOC100289018 hypothetical protein XP_002342868
N7 Gel8	IPI00026302	14454	38	3 (1)	RPL31 60S ribosomal protein L31
N7 Gel8	IPI00218065		38	5 (0)	CACNA2D4 Isoform 1 of Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-4
N7 Gel8	IPI00853061	113155	37	5 (1)	COL6A3 alpha 3 type VI collagen isoform 2 precursor
N7 Gel8	IPI00871621	132128	37	7 (0)	COL6A3 132 kDa protein
N7 Gel8	IPI00020058		37	2 (1)	ATP7B Isoform 1 of Copper-transporting ATPase 2

Tabelle 31: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie in der kombinierten Suche mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine aus den Pulldown-Experimenten mit dem Fusionsprotein GST-TRPV5-C4 aus Ansätzen mit Plazentamikrosomen. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant waren. Der Score ist ab einem Wert von 36 signifikant.

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel1	IPI00455315	38580	2758	135	ANXA2 Annexin A2
C4 Gel1	IPI00218918	38690	982	44	ANXA1 Annexin A1
C4 Gel1	IPI00012074	70899	822	66	HNRNPR Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
C4 Gel1	IPI00644055				isoform 1
C4 Gel1	IPI00402183	62617	432	32	SYNCRIP Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
C4 Gel1					SYNCRIP synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein isoform
C4 Gel1	IPI00010204	19318	314	34	SFRS3 Splicing factor, arginine/serine-rich 3
C4 Gel1	IPI00302133	82497	284	8 (0)	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
C4 Gel1	IPI00002547	74529	180	23	CAPN6 Calpain-6
C4 Gel1	IPI00021266	17684	152	12	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
C4 Gel1	IPI00007289	59482	125	7 (1)	ALPP Alkaline phosphatase, placental type precursor
C4 Gel1	IPI00011134	40220	100	2 (1)	HSPA7 Putative heat shock 70 kDa protein 7
C4 Gel1	IPI00003865				HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
C4 Gel1	IPI00219483	50587	87	11 (2)	SNRNP70 Isoform 2 of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa
C4 Gel1	IPI00376798	20240	83	4	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11
C4 Gel1	IPI00220327	65999	83	23 (1)	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel1	IPI00003362	72377	63	9 (1)	HSPA5 HSPA5 protein
C4 Gel1	IPI00413324	21383	62	7 (1)	RPL17 60S ribosomal protein L17
C4 Gel1	IPI00644712	69799	50	8 (1)	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
C4 Gel1	IPI00219757	23341	47	3	GSTP1 Glutathione S-transferase P
C4 Gel1	IPI00007461	77267	46	1	DPY19L1 Isoform 1 of Protein dpy-19 homolog 1
C4 Gel1	IPI00009797		46	1	TM7SF3 Transmembrane 7 superfamily member 3
C4 Gel1	IPI00019359	62027	45	7 (0)	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
C4 Gel1	IPI00005613	27854	42	5 (1)	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
C4 Gel1	IPI00550021	46080	41	4 (2)	RPL3 60S ribosomal protein L3
C4 Gel1	IPI00220706	16130	40	1	HBG1;HBG2 Hemoglobin subunit gamma-1
C4 Gel1	IPI00008483	59644	40	6 (0)	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
C4 Gel1	IPI00003918	47667	40	7 (0)	RPL4 60S ribosomal protein L4
C4 Gel1	IPI00935718	5660	39	2 (2)	LOC100293239;LOC100290044;LOC100289018 hypothetical protein XP_002342868
C4 Gel1	IPI00854612	24222	39	2 (2)	BTK Dominant-negative kinase-deficient Brutons tyrosine kinase isoform 3
C4 Gel1	IPI00025091	18419	39	3 (1)	RPS11 40S ribosomal protein S11
C4 Gel1	IPI00247583	18553	39	4 (1)	RPL21;RPL21P19 60S ribosomal protein L21
C4 Gel1	IPI00396321		39	4 (1)	LRRC59 Leucine-rich repeat-containing protein 59
C4 Gel1	IPI00031554		39	3 (1)	DDX50 ATP-dependent RNA helicase DDX50
C4 Gel1	IPI00013508	102993	39	2 (2)	ACTN1 Alpha-actinin-1
C4 Gel1	IPI00739770		38	3 (1)	C2orf77 hypothetical protein LOC129881
C4 Gel5	IPI00418169	40386	944	45	ANXA2 annexin A2 isoform 1
C4 Gel5	IPI00302133	82497	416	21	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
C4 Gel5	IPI00477090	51805	303	14	- Protein (Ig's)
C4 Gel5	IPI00295771	60064	263	11	CYP11A1 Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial
C4 Gel5	IPI00008483	59644	236	20	MAOA Amine oxidase [flavin-containing] A
C4 Gel5	IPI00218918	38690	216	8	ANXA1 Annexin A1
C4 Gel5	IPI00550021	46080	205	11	RPL3 60S ribosomal protein L3
C4 Gel5	IPI00000494	34341	166	14	RPL5 60S ribosomal protein L5
C4 Gel5	IPI00299573	29977	152	9	RPL7A 60S ribosomal protein L7a

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel5	IPI00009865	58818	138	20	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
C4 Gel5	IPI00927255	22028	138	10	LANCL1 cDNA FLJ51489, highly similar to LanC-like protein 1
C4 Gel5	IPI00005724	45254	138	12	LANCL1 LanC-like protein 1
C4 Gel5	IPI00003918	47667	139	8 (3)	RPL4 60S ribosomal protein L4
C4 Gel5	IPI00012772	28007	129	7 (2)	RPL8 60S ribosomal protein L8
C4 Gel5	IPI00848226	35055	95	5	GNB2L1 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
C4 Gel5	IPI00220327	65999	92	21	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
C4 Gel5	IPI00003362	72377	87	10 (1)	HSPA5 HSPA5 protein
C4 Gel5	IPI00644712	69799	83	4 (1)	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
C4 Gel5	IPI00470674	34073	81	4 (2)	CYB5R1 NADH-cytochrome b5 reductase 1
C4 Gel5	IPI00013328	39650	72	2 (1)	TUSC3 Isoform 1 of Tumor suppressor candidate 3
C4 Gel5	IPI00007461	77267	70	2 (0)	DPY19L1 Isoform 1 of Protein dpy-19 homolog 1
C4 Gel5	IPI00303476	56525	57	5 (2)	ATP5B ATP synthase subunit beta, mitochondrial
C4 Gel5	IPI00293665	60030	44	7 (1)	KRT6B Keratin, type II cytoskeletal 6B
C4 Gel5	IPI00219757	23341	42	4 (1)	GSTP1 Glutathione S-transferase P
C4 Gel5	IPI00095891		40	2 (1)	GNAS Isoform XLas-1 of Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas
C4 Gel5	IPI00011253	26671	39	3 (1)	RPS3 40S ribosomal protein S3
C4 Gel5	IPI00219299		39	2 (1)	TLN2 Talin-2
C4 Gel8	IPI00298497	55892	957	33	FGB Fibrinogen beta chain
C4 Gel8	IPI00152906	13928	529	22	HIST1H2BD Histone H2B type 1-D
C4 Gel8	IPI00453473	11360	503	27	HIST1H4I;HIST1H4C;HIST1H4F;HIST1H4D;HIST1H4B;HIST1H4H; HIST2H4B;HIST1H4E;HIS
C4 Gel8	IPI00021891	51479	451	19	FGG Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain
C4 Gel8	IPI00019502	226392	325	36	MYH9 Isoform 1 of Myosin-9
C4 Gel8	IPI00218918	38690	288	9	ANXA1 Annexin A1
C4 Gel8	IPI00021439	41710	279	9	ACTB Actin, cytoplasmic 1
C4 Gel8	IPI00002547	74529	252	20	CAPN6 Calpain-6
C4 Gel8	IPI00397526	228858	233	25 (1)	MYH10 Isoform 1 of Myosin-10
C4 Gel8	IPI00554788	48029	195	15	KRT18 Keratin, type I cytoskeletal 18
C4 Gel8	IPI00302133	82497	177	10	TRPV5 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5

Probe	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
C4 Gel8	IPI00037070	53541	142	7	HSPA8 54 kDa protein
C4 Gel8	IPI00012074	70899	132	7	HNRNPR Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
C4 Gel8	IPI00554648	53671	107	25	KRT8 Keratin, type II cytoskeletal 8
C4 Gel8	IPI00030179	29207	106	1	RPL7P32;RPL7 60S ribosomal protein L7
C4 Gel8	IPI00021266	17684	96	1	RPL23A 60S ribosomal protein L23a
C4 Gel8	IPI00026272	14127	89	5	HIST1H2AE;HIST1H2AB;HIST1H2AM;HIST1H2AL;HIST1H2AJ;HIST1H2AG;HIST1H2AI;HIST1
C4 Gel8	IPI00219757	23341	85	2 (1)	GSTP1 Glutathione S-transferase P
C4 Gel8	IPI00217030	29579	67	1	RPS4X 40S ribosomal protein S4, X isoform
C4 Gel8	IPI00013296	17708	59	4 (1)	RPS18;RPS18P9 40S ribosomal protein S18
C4 Gel8	IPI00171196	45839	54	(0)	KRT13 keratin 13 isoform b
C4 Gel8	IPI00644712	69799	52	2 (1)	XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
C4 Gel8	IPI00644087	69207	50	11 (0)	LMNA Progerin
C4 Gel8	IPI00935718	5660	49	6 (3)	LOC100293239;LOC100290044;LOC100289018 hypothetical protein XP_002342868
C4 Gel8	IPI00026271	16263	49	2 (1)	RPS14 40S ribosomal protein S14
C4 Gel8	IPI00219155	15788	49	2 (1)	RPL27 60S ribosomal protein L27
C4 Gel8	IPI00291467	32845	49	5 (1)	SLC25A6 ADP/ATP translocase 3
C4 Gel8	IPI00012750	13734	44	2 (1)	RPS25 40S ribosomal protein S25
C4 Gel8	IPI00025683		40	2 (1)	TACC1 Isoform 1 of Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1
C4 Gel8	IPI00219153	14778	39	3 (1)	RPL22 60S ribosomal protein L22
C4 Gel8	IPI00856012		39	2 (1)	COL6A6 Isoform 1 of Collagen alpha-6(VI) chain
C4 Gel8	IPI00064350		38	1	C12orf52 Isoform 1 of Uncharacterized protein C12orf52
C4 Gel8	IPI00400875	95938	37	3 (1)	USP6NL USP6 N-terminal like isoform 2
C4 Gel8	IPI00001497	102365	36	1	PCDHA3 Isoform 1 of Protocadherin alpha-3

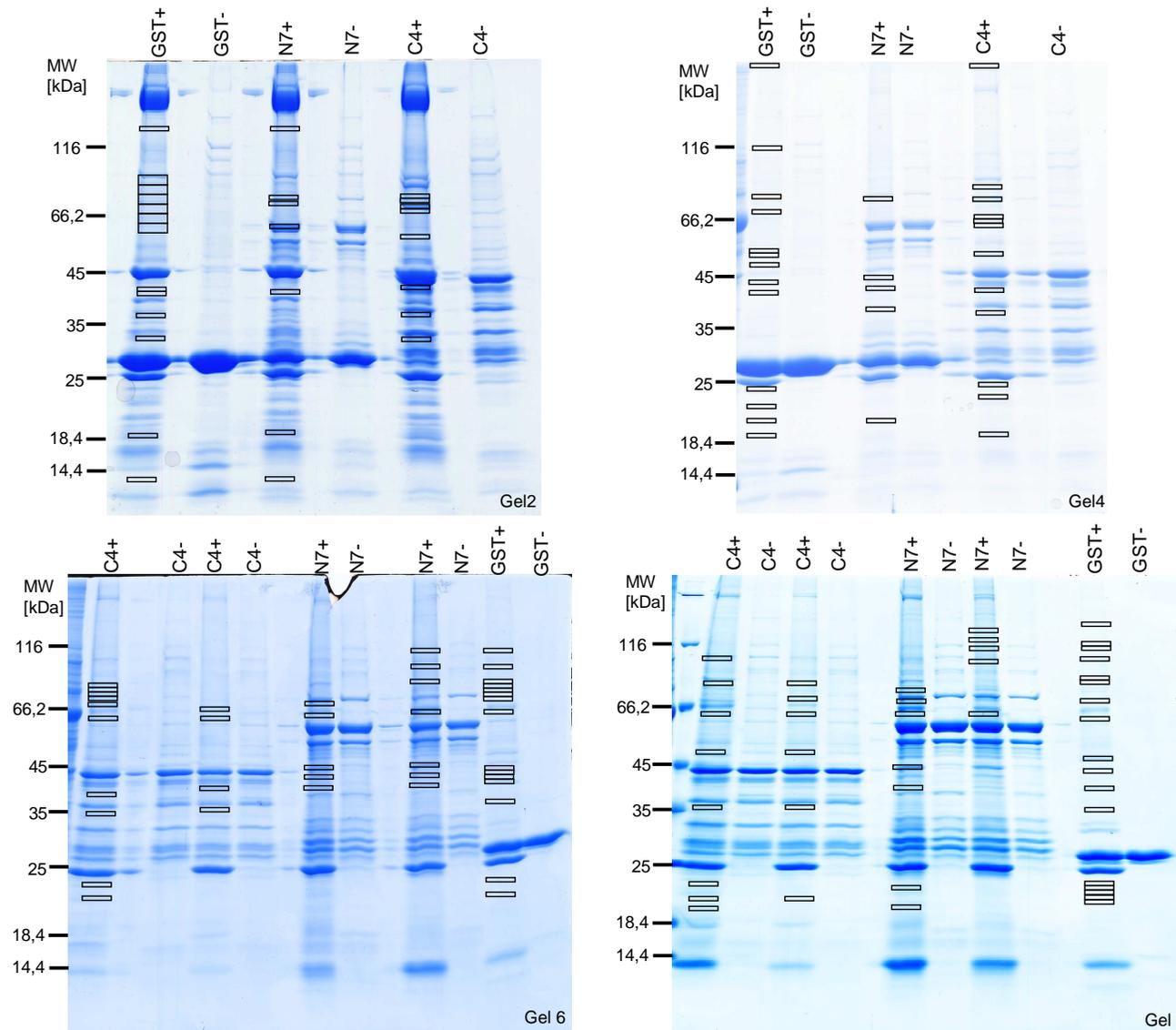


Abb. 43: Blue Silver gefärbte SDS-Gele von Pull-down-Experimenten mit TRPV5 Fusionsproteinen aus Plazentahomogenat.
 Die durch Kästen gekennzeichneten Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und nach entsprechender Vorbereitung massenspektrometrisch analysiert. Banden aus einer Spur wurden für die kombinierte Suche jeweils zusammengefasst.

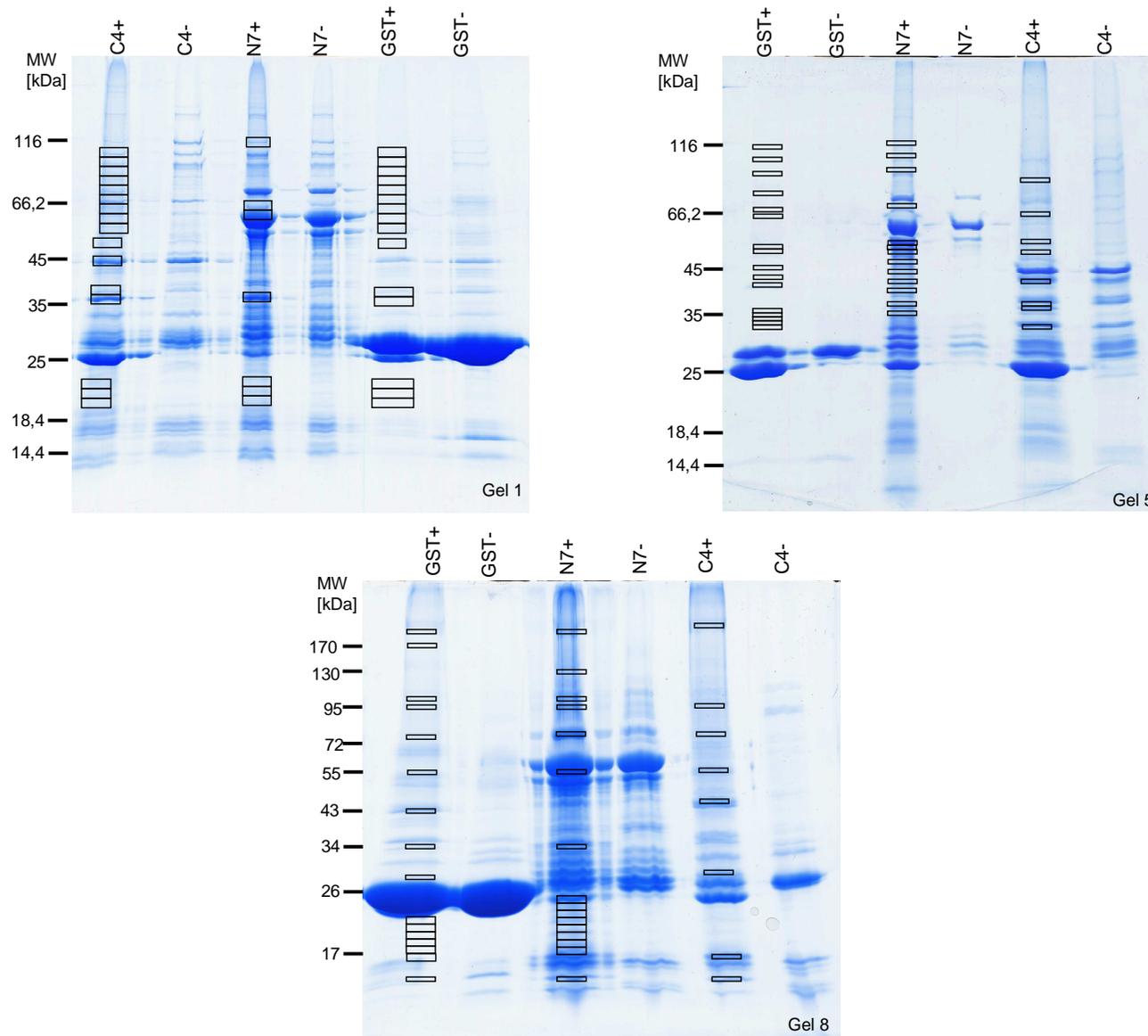


Abb. 44: Blue Silver gefärbte SDS-Gele von Pull-down-Experimenten mit TRPV5 Fusionsproteinen aus Plazentamikrosomen. Die durch Kästen gekennzeichneten Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und nach entsprechender Vorbereitung massenspektrometrisch analysiert. Banden aus einer Spur wurden für die kombinierte Suche jeweils zusammengefasst.

Tabelle 32: Liste aller mittels ESI-Massenspektrometrie mit signifikantem Gesamtscore identifizierten Proteine nach einer IP mit dem Antikörper 982/3 bzw. des Präimmunsersums (Prä) von Tier 982/3. Die Angabe der Bandennummer entspricht den in Abb. 34 markierten nummerierten Kästen. Die Anzahl der signifikanten Peptide wurde nur angegeben, wenn weniger als 3 Peptide signifikant sind. Der Score ist ab einem Wert von 34 signifikant. In der Abbildung 34 nummerierte Banden, die nicht aufgeführt sind, lieferten keine signifikanten Proteine.

Bande #	IPI-Nr.	Masse [Da]	Score	Anzahl gefundener Peptide (davon signifikant)	Gensymbol/Proteinname
1	IPI00003362	72377	136	13 (1)	HSPA5 HSPA5 protein
	IPI00477090	51805	168	7 (2)	- Protein
	IPI00020210	237230	98	8 (0)	DYSF Dysferlin
3	IPI00007765	73635	57	3 (0)	HSPA9 Stress-70 protein, mitochondrial
4	IPI00791534	103811	558	24 (5)	- 104 kDa protein
	IPI00926256	101727	558	24 (5)	SLC4A1 Band 3 anion transport protein
	IPI00021439	41710	445	17 (4)	ACTB Actin, cytoplasmic 1
	IPI00384938	52819	163	7 (2)	IGHV4-31 IGHG1 Putative uncharacterized protein D
	IPI00216704	267661	144	17 (0)	SPTB Isoform 2 of Spectrin beta chain, erythrocyte
	IPI00748330	208110	139	9 (0)	ANK1 Isoform Br21 of Ankyrin-1
	IPI00220741	279826	135	13 (0)	SPTA1 Isoform 1 of Spectrin alpha chain, erythrocyte
	IPI00550731	26218	111	4 (1)	- Putative uncharacterized protein
	IPI00154742	24777	106	6 (2)	LOC100290481;IGLV2-14
	IPI00246994	42427	94	4 (1)	HSD3B1 Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isom
	IPI00455315	38580	93	9 (1)	ANXA2 Annexin A2
	IPI00218918	38690	81	5 (1)	ANXA1 Annexin A1
	IPI00646304	23728	77	2 (1)	PPIB Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
	IPI00399007	46032	69	5 (1)	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)
	IPI00654755	15988	46	4 (0)	HBB Hemoglobin subunit beta
	IPI00024067	191493	39	5 (0)	CLTC Isoform 1 of Clathrin heavy chain 1
	IPI00218918	38690	38	2 (0)	ANXA1 Annexin A1
5	IPI00218918	38690	38	2 (0)	ANXA1 Annexin A1
9 (Prä)	IPI00220327	65999	204	11 (3)	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
11 (Prä)	IPI00220327	65999	218	10 (2)	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
12 (Prä)	IPI00220327	65999	248	13 (3)	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1

8.3 Veröffentlichungen

Stumpf, T., Zhang, Q., Hirnet, D., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Wissenbach, U., Dörr, J., Lohr, C., Deitmer, J.W., Fecher-Trost, C. (2008): The human TRPV6 channel protein is associated with cyclophilin B in human placenta. *J.Biol.Chem.* **283**: 18086-18098

Dörr, J., Fecher-Trost C. (2010): TRP channels in female reproductive organs and placenta. Buchkapitel in: The transient receptor potential channel. Ed. Md. Shahidul Islam, Serie: Advances in Experimental medicine and Biology, Springer Verlag (*in press*).

Dörr, J., Himmerkus N., Bleich M., and Fecher-Trost, C.: Expression and immunolocalization of TRPV5 calcium channel proteins in mouse and human placenta (in Vorbereitung)

Lebenslauf

Name: Janka Dörr
Geburtsdatum: 27.12.1981
Geburtsort: Saarbrücken
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulausbildung

1988 - 1992 Grundschule Eppelborn-Wiesbach
1992 - 2001 Illtal-Gymnasium Illingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2001 – 2006 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes
 (Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie)
Abschluss: Diplom
2003 Vordiplom Biologie
2006 Diplomarbeit in der Abteilung der Medizinischen Biochemie und
 Molekularbiologie (AG Montenarh)
Thema: " Die Rolle der CK2 α und α' beim RNA-Spleißen"

Promotion

Seit 2007 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern,
 Fachbereich Biologie, Arbeitsgruppe Proteinfunktion/Proteomics unter
 der Leitung von Jun. Prof. Dr. Claudia Fecher-Trost

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Jun. Prof. Dr. Claudia Fecher-Trost, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gute Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken. Ebenso danke ich Ihr für Ihre stetige Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. E. Friauf danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit meine Proben am ESI-Massenspektrometer der Arbeitsgruppe Tierphysiologie messen zu lassen, sowie die Möglichkeit den Kryostat für Gewebeschnitte zu nutzen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hahn bedanke ich mich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Bei Frau Dr. Nina Himmerkus möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bei den immunhistochemischen Versuchen und die hilfreichen Anmerkungen bei allen in diesem Zusammenhang auftretenden Fragen bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dipl. Biochem. Thomas Schulenburg, für die Messung der zahlreichen Proben am ESI-Massenspektrometer und die vielen Erklärungen bei Fragen zum ESI-Massenspektrometer, zur Auswertung der Proben und die Lösung des ein oder anderen computertechnischen Problems. Ein Dank auch dafür, dass er es irgendwie immer geschafft hat alle meine Proben doch noch zu messen.

Herrn Prof. Dr. Deitmer danke ich für die Möglichkeit das konfokale Mikroskop der Abteilung zu nutzen und Frau Dr. Anne Rieger für Hilfe bei den Aufnahmen der Fluoreszenzbilder.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Flockerzi, Pharmakologie, Universität des Saarlandes, möchte ich für die Bereitstellung der transfizierten HEK- und COS-Zellen danken.

Außerdem möchte ich mich bei Sabine Pelvay bedanken, dass die Organisation zur Abholung der Seren so reibungslos funktioniert hat und es kein Problem war, wenn außer einem Kaninchenserum auch mal die Nachfrage nach dem einen oder anderen Kaninchenorgan da war.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Proteinfunktion/Proteomics bedanken. Tobias Stumpf danke ich für die vielen Erklärungen gerade zu Beginn meiner Arbeit und dafür, dass er entscheidend dazu beigetragen hat, dass ich mich schnell in dem neuen Labor zu Recht gefunden habe. Auch Qi Zhang möchte ich für die nette Aufnahme in die Gruppe danken und die vielen Diskussionen, nicht nur zu wissenschaftlichen Themen sowie die Möglichkeit einiges über die chinesische Kultur zu erfahren. Ein Dank geht ebenso an den Forschungspraktikanten, Diplomanden und mittlerweile schon Doktoranden Pascal Schalkowsky, vor allem für das kurzfristige Korrekturlesen der Arbeit. Natürlich möchte ich auch den Diplomand(innen) Nicole Seißler, Tao Tan und Simone Kalinke, die immer für ein gesundes Lachen gut ist, sowie Barbara Lang für die nette Zusammenarbeit im Labor danken. Nicht zuletzt danke ich der Forschungspraktikantin Désirée Junk und den Bachelorstudentinnen Miriam Freyler und Viktoria Käfer, sowie unserer HiWi und jetzigen Diplomandin Tina Keller. Nicht zu vergessen sind die helfenden Hände der technischen Assistentinnen, Dagmar Groß, Sandra Bergstein und Christine Förster-Schorr, die alle ihren Beitrag zum Entstehen dieser Arbeit geleistet haben. Ein weiterer Dank geht auch an die Sekretärinnen Frau Gabriele Seidel und Frau Reante Feth., die während der Zeit meiner Doktorarbeit das Laborleben erleichtert haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich bei der Erreichung meiner Ziele immer tatkräftig, nicht nur finanziell unterstützt haben, und immer an mich glauben. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit gar nicht möglich gewesen. Selbst die vielen Fach- und Fremdwörter haben sie nicht davor abgeschreckt mich beim Korrekturlesen der Arbeit zu unterstützen. Ein ganz herzlicher Dank geht natürlich auch an meine Schwester, auf die man wenn's drauf ankommt immer zählen kann und die sich auch in letzter Minute noch an das Korrekturlesen der Arbeit gemacht hat. Auch dem Rest meiner Familie möchte ich auf diesem Weg einfach mal Danke sagen.

Ein letzter aber dafür umso größerer Dank geht an meinen Freund Thorsten, der immer Verständnis dafür zeigt, wenn die Arbeit mal wieder Vorrang hat und mich gerade in der letzten Phase meiner Arbeit unterstützt hat. Bei ihm hat selbst Word mit seinen kleinen Macken keine Chance mehr. Danke für alles!!!